

Ersättning av djurproteiner med plantproteiner i kosten och dess inverkan på halten av N-nitroso föreningar i avföringen hos friska människor

Pro gradu avhandling

Jessica Manngård

Näringslära

Avdelningen för livsmedels- och näringsvetenskaper

Helsingfors Universitet

Mars 2019

Handledare: Anne-Maria Pajari,

universitetslektor och docent

Essi Päivärinta,

forskningsdoktor

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Agrikultur- och forstvetenskapliga fakulteten		Avdelningen för livsmedels- och näringsvetenskaper	
Tekijä/Författare – Author			
Jessica Manngård			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Ersättning av djurproteiner med plantproteiner i kosten och dess inverkan på halten av N-nitroso föreningar i avföringen hos friska människor			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Näringslära			
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
Pro gradu	Mars 2019	77	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Bakgrund och mål: Kolorektal cancer är den fjärde vanligaste formen av cancer i världen och den tredje vanligaste i Finland. Man räknar med att ungefär en tredjedel av fallen uppkommer som en följd av livsstilsfaktorer. En del undersökningar har till och med föreslagit att 30 - 70 % av fallen kan bero på kosten. En kost med en mindre mängd rött och processat kött, har i en del undersökningar kunnat ses kopplas till en mindre risk för kolorektal cancer. Processat kött anses ha ett övertygande samband med kolorektal cancer och rött kött anses även ha ett troligt samband. En möjlig orsak till detta kan vara bildningen av N-nitroso föreningar (NOC) som det röda och processade köttet kan ge upphov till. NOC anses vara potentiellt cancerframkallande föreningar då de står i kontakt med tarmens yta. Målet med den här avhandlingen var att undersöka om det finns någon skillnad i mängden NOC i avföringen hos friska människor, då man ersätter protein från animaliska källor i kosten, med samma mängd protein från plantkällor.</p> <p>Material och metoder: Avhandlingen är en del av undersökningen ScenoProt vid Helsingfors universitet, där man undersöker vilken påverkan dieter med olika typer av proteinkällor har på markörer för hälsa. Undersökningen utfördes 2017 och var en kontrollerad klinisk interventionsstudie med parallell och randomiserad design. Deltagarna var frivilliga friska människor i åldrarna 20 - 69 år. Interventionsperioden pågick under 12 veckors tid och deltagarna delades in i tre olika kostgrupper. I grupp 1 (n=48) bestod andelen proteiner i kosten av 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, i grupp 2 (n=48) 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och i grupp 3 (n=49) 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner. Avföringsprover samlades in före interventionsperiodens början och under dess sista vecka. Deltagarna fyllde i matdagbok under fyra dagar före interventionsperioden, fyra dagar under dess sista vecka och under en dag per tre veckor under periodens tid. Avföringsproverna analyserades för mängden N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar med en NO-analysator som mäter den kväveoxid som frigörs från kväveföreningar. De statistiska analyserna utfördes med IBM SPSS Statistics. Variansanalyser mellan grupperna utfördes med Bonferroni test och korrelation undersöktes med Pearson test. För statistisk signifikans användes gränsen <0,05.</p> <p>Resultat: Den slutliga mängden deltagare var 136 människor, 107 kvinnor och 29 män. Man kunde se en dosberoende minskning i den totala mängden NOC mellan grupperna (grupp 1: $4,0 \pm 2,4$, grupp 2: $3,2 \pm 1,8$, grupp 3: $2,7 \pm 1,5$ pmol/mg). Det fanns en betydelsefull skillnad i mängden N-nitroso föreningar ($p=0,000$), N-hem föreningar ($p=0,000$) och mängden N-tiol föreningar ($p=0,030$) mellan grupperna 1 och 3 under slutet av interventionsperioden. En betydelsefull skillnad i mängden N-hem föreningar ($p=0,035$) mellan grupperna 2 och 3 observerades också. Mängden protein i kosten korrelerade inte med mängden NOC i avföringen ($p=0,622$), däremot korrelerade det totala fiberintaget och mängden NOC (0,036). Avföringsvikten ökade stegvis från grupp 1 till grupp 3 och avföringsvikten kunde ses korrelera med mängden fiber ($p=0,000$) och mängden NOC ($p=0,000$).</p> <p>Slutledningar: Ersättning av djurproteiner med plantproteiner i kosten får till stånd en dosberoende minskning av mängden NOC i avföringen. Därför kan en kost med en större mängd plantproteiner och en mindre mängd djurproteiner, till viss del skydda mot utvecklingen av kolorektal cancer. Den ökade mängden fiber i en plantproteinbaserad kost kan till viss del bidra till den observerade minskningen av NOC, eftersom fiber i vissa fall kunnat ses hämma bildningen av NOC. Utgående från resultat från tidigare undersökningar, är det ändå mest troligt att skillnaden i NOC till största del beror på skillnaden i proteinkällor.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Kost, plantproteiner, djurproteiner, kolorektal cancer, n-nitroso föreningar			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Agrikultur- och forstvetenskapliga fakulteten, Avdelningen för livsmedels- och näringsvetenskaper, Näringslära			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Handledare: Anne-Maria Pajari och Essi Päivärinta			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Faculty of Agriculture and Forestry		The Department of food and nutrition	
Tekijä/Författare – Author			
Jessica Manngård			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Replacement of animal proteins with plant proteins and its effect on the amount of faecal N-nitroso compounds in healthy humans			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Nutrition science			
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
Master's thesis	March 2019	77	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Background and aim: Colorectal cancer is the fourth most common form of cancer in the world and the third most common in Finland. One third of the cases are supposed to origin from lifestyle factors. Some studies have even suggested that as much as 30 - 70 % of the cases can originate from the diet. A diet with a smaller amount of red and processed meat has in some studies been associated to a smaller risk for developing colorectal cancer. Processed meat is considered to have a convincing connection to colorectal cancer and red meat is considered to have a possible connection. A possible explanation to this can be the formation of N-nitroso compounds (NOC) which arises from red meat. NOCs are considered to be potentially cancer-causing compounds, when they come in contact with the surface of the intestine. The aim of this study was to examine whether there is a difference in the amount of NOCs in the faeces among healthy humans, when replacing proteins from animal sources in the diet with an equal amount of proteins from plant sources.</p> <p>Material and methods: This thesis is a part of the study ScenoProt at the University of Helsinki. ScenoProt examines which effect diets with different types of protein sources have on markers for health. The study was conducted in 2017 as a controlled clinical intervention study with parallel and randomized design. The participants were voluntary healthy humans between the ages of 20 and 69 years. The intervention period lasted 12 weeks and the participants were allocated into three different diet groups. In group 1 (n=48) the amount of protein in the diet consisted of 70 % animal proteins and 30 % plant proteins, in group 2 (n=48) 50 % animal proteins and 50 % plant proteins and in group 3 (n=49) 30 % animal proteins and 70 % plant proteins. Faecal samples were collected before the intervention period and during its last week. The participants kept a food diary four days before the intervention period, four days during its last week and 1 day/three weeks during its time. Faecal samples were analysed for the amount of N-nitroso compounds, N-haem compounds and N-thiol compounds with a NO-analyser that measures the nitrogen oxide released from nitrogen compounds. The statistical analyses were carried out with IBM SPSS Statistics. Variance analysis between groups were carried out with Bonferroni test and correlation was examined with Pearson test. As the limit for statistical significance, <0,05 was used.</p> <p>Results: 136 participants, 107 women and 29 men, completed the study. A dose-dependent decrease in total NOC concentration was observed between the groups (group 1: $4,0 \pm 2,4$, group 2: $3,2 \pm 1,8$, group 3: $2,7 \pm 1,5$ pmol/mg). There was a significant difference in the amount of N-nitroso compounds ($p=0,000$), N-haem compounds ($p=0,000$) and N-thiol compounds ($p=0,030$) between groups 1 and 3 at the end of the intervention. A significant difference in N-haem compounds ($p=0,035$) was also observed between groups 2 and 3. The amount of protein in the diet didn't correlate with the amount of NOC in the faeces ($p=0,622$), whereas the total intake of fibre did correlate with the amount of NOC ($p=0,036$). The faecal weight increased gradually from groups 1 to 3 and the weight correlated with the amount of fibre ($p=0,000$) in the diet and the amount of NOC ($p=0,000$).</p> <p>Conclusion: A replacement of animal proteins with plant proteins in the diet leads to a dose-dependent decrease in the amount of NOC in the faeces. A diet with a greater amount of plant proteins and a smaller amount of animal proteins might therefore protect against the development of colorectal cancer. The increased amount of fibre in a plant protein-based diet might to some extent contribute to the decrease in NOC, since fibre in some cases has been seen to decrease the formation of NOC. Seen to previous studies, it is however most likely that the decrease in NOC is mostly attributed to the differences in protein sources.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Diet, plant proteins, animal proteins, colorectal cancer, n-nitroso compounds			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Faculty of Agriculture and Forestry, The Department of food and nutrition, Nutrition science			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Supervisors: Anne-Maria Pajari and Essi Päivärinta			

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

FÖRKLARINGAR	6
1. INLEDNING.....	7
2. LITTERATURÖVERSIKT	9
2.1 Kolorektal cancer.....	9
2.1.1 Incidens och utbredning.....	9
2.1.2 Typer av kolorektal cancer	9
2.1.3 Bakomliggande orsaker	10
2.1.4 Förebyggande av kolorektal cancer	11
2.2 Kolorektal cancer och kost	12
2.2.1 Fjäderfä och fisk	12
2.2.2 Mjolkprodukter och kalcium	13
2.2.3 Fukt och grönsaker.....	14
2.2.4 Fiber.....	14
2.2.5 Plantbaserad kost	15
2.3 Kolorektal cancer och rött och processat kött	16
2.3.1 Hemjärn i rött kött.....	17
2.3.2 HCA och PAH föreningar.....	18
2.3.4 N-nitroso föreningar.....	19
2.3.5 N-glykolyt-neuraminsyra	19
2.4 N-nitroso föreningar	20
2.4.1 Definition och typer.....	20
2.4.2 Bildning.....	20
2.4.3 Samband med kolorektal cancer.....	22
2.4.4 N-nitroso föreningar i avföringen.....	23
3. UNDERSÖKNINGENS MÅL	25
4. MATERIAL	26
4.1 Typ av undersökning	26
4.2 Undersökningsdeltagare	26
4.3 Testdieter	27
4.4 Insamlat material.....	29
5. METODER	30
5.1 Avföringsprov	30
5.1.1 Insamling av avföringsprov.....	30
5.1.2 Framställning av avföringshomogenat	31

5.1.3 Använda lösningar	31
5.1.4 Förberedelse av avföringsprover för analys	32
5.1.5 Analys av N-nitroso föreningar	33
5.2 Statistiska metoder	35
5.3 Etiska frågor och dataskydd	36
6. RESULTAT	37
6.1 Bakgrundsinformation	37
6.2 N-nitroso föreningar	37
7. DISKUSSION	46
7.1 Granskning av undersökningsresultaten	46
7.2 Jämförelse med tidigare undersökningar	48
7.3 Proteinkällornas betydelse för kolorektal cancer	52
7.5 Undersökningens styrkor och svagheter	55
7.6 Undersökningens betydelse och framtid	57
8. SLUTSATSER	60
LITTERATURREFERENSER	61
BILAGOR	71
Bilaga 1: Instruktioner för tagning av avföringsprov (slutskedet)	71
Bilaga 2: Avföringsvikt och korrelation	75
Bilaga 3: Intag av fiber och protein	77

FÖRKLARINGAR

AT	Adenin-tymin
BaP	Benso[a]pyren, <i>engl. benzo[a]pyrene</i>
DTPA	Dietylen triamin penta-ättiksyra, <i>engl. diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
FAP	Familjär adenomatös polypos, <i>engl. familial adenomatous polyposis</i>
GC	Guanin-cytosin
HCA	Heterocykliska aminer, <i>engl. heterocyclic amines</i>
HCl	Saltsyra, <i>engl. hydrochloric acid</i>
HNPCC	Hereditär nonpolyposis kolorektal cancer, <i>engl. hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
HPLC	Hög prestanda vätskekromatografi, <i>engl. high performance liquid chromatography</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
Kolorektal cancer	Gemensamt namn för tjocktarms- och ändtarmscancer
MMR	DNA-reparationsgener, <i>engl. mismatch repair genes</i>
NDMA	N-nitrosodimetylamin, <i>engl. N-nitrosodimethylamine</i>
Neu5Gc	N-glykoly-l-neuraminsyra, <i>engl. N-glycolylneuraminic acid</i>
NOC	N-nitroso föreningar, <i>engl. N-nitroso compounds</i>
NO	Kväveoxid, <i>engl. nitric oxide</i>
PAH	Polycykliska aromatiska kolväten, <i>engl. polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
O6CMeG	O6-karboxymetyl-2'-deoxi-guanosin, <i>engl. O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine</i>
Rpm	Varv per minut, <i>engl. rounds per minute</i>
SA	Sur sulfanilamide lösning, <i>engl. acidic sulphanilamide</i>
WCRF	World Cancer Research Fund
WHO	World Health Organization

1. INLEDNING

Kolorektal cancer är den fjärde vanligaste formen av cancer i hela världen (WCRF 2017) och i Finland den andra vanligaste cancerformen hos kvinnor och den tredje vanligaste hos män (Suomen syöpärekisteri 2016). Gällande dödlighet i någon typ av cancer ligger kolorektal cancer i toppen bland icke-rökare i välutvecklade länder, vilket innebär att förebyggande av kolorektal cancer är av betydelse för den globala hälsan (Bastide m.fl. 2011). Man räknar med att ungefär en tredjedel av fallen beror på livsstilsfaktorer, av vilka kosten är en betydelsefull del (Järvinen m.fl. 2013). I en del undersökningar har man till och med uppskattat att så mycket som 30–70 % av fallen kan ha en bakgrund i kosten (Miller m.fl. 2013).

Speciellt en hög konsumtion av processat kött och rött kött anses öka risken för kolorektal cancer (Norat m.fl. 2005, WCRF 2017). En kost med stora mängder rött och processat kött har i meta-analyser av prospektiva studier kunnat kopplas till en ökad risk för kolorektal cancer jämfört med en kost med mindre mängder rött och processat kött (Chan m.fl. 2011, Larsson m.fl. 2006). I flera undersökningar har man också kunnat se att halten av N-nitroso föreningar ofta är betydligt högre i avföringen hos de som ätit en kost med mycket rött kött, jämfört med de som ätit en kost som innehåller litet rött kött eller är plantbaserad (Joosen m.fl. 2009, Kuhnle m.fl. 2007). En orsak till sambandet mellan kolorektal cancer och rött och processat kött, kan vara bildningen av N-nitroso föreningar som köttet antas ge upphov till (Tricker m.fl. 1991).

N-nitroso agenter kan bildas då aminer eller amider reagerar med nitroserande agenser, vilka härstammar från nitriter och nitrater (Dunrow m.fl. 2010). Speciellt i processat kött finns det rikligt av aminer, amider och nitriter (Tricker m.fl. 1991). Rött kött innehåller även stora mängder hemjärn, som i en del fall kunnat ses främja bildningen av N-nitroso föreningar (Cross m.fl. 2004). N-nitroso föreningar kan vara karcinogena då de står i kontakt med tarmens yta och de anses vara antagligen cancerframkallande föreningar för människan (IARC 2006). De metaboliter som härstammat från N-nitroso föreningar kan ge skador på DNA och genom denna mekanism öka risken för kolorektal cancer (Alfadda m.fl. 2012).

Målet med den här undersökningen är att undersöka om det finns någon skillnad i mängden N-nitroso föreningar i avföringen mellan friska människor, då man ersätter en del av djurproteinkällorna i kosten med plantproteinkällor. Materialet till den här undersökningen

har erhållits från undersökningen ScenoProt, där man undersöker vilken påverkan en ersättning av djurproteiner med plantproteiner i kosten har på markörer för hälsa. ScenoProt är en kontrollerad klinisk interventionsstudie, med randomiserad och parallell design. Deltagarna var frivilliga friska människor och de delades in i tre olika dietgrupper, där olika stora andelar djurproteinkällor i kosten ersattes med plantproteinkällor. Interventionsperioden utfördes under våren 2017 och pågick i 12 veckors tid. I min avhandling använde jag mig av de avföringsprover som samlats in före interventionsperiodens början och under dess sista vecka, för analysen av totala mängden N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar.

2. LITTERATURÖVERSIKT

2.1 Kolorektal cancer

2.1.1 Incidens och utbredning

Kolorektal cancer är ett gemensamt namn för tjocktarmscancer och ändtarmscancer. I Finland var den åldersstandardiserade incidensen för tjocktarmscancer bland kvinnor 35,44/100 000 personer och bland män 42,09/100 000 personer år 2016 (Suomen syöpärekisteri 2016). Motsvarande siffror för ändtarmscancer var 16,03/100 000 för kvinnor och 28,34/100 000 för män. År 2016 konstaterades 3360 nya fall av tjocktarms- och ändtarmscancer i Finland. Av dessa fall konstaterades 1625 hos kvinnor och 1735 hos män (Suomen syöpärekisteri 2016). Medelåldern för att insjukna i ändtarmscancer är 70 år medan medelåldern för tjocktarmscancer är 72 år. Hos de som är yngre än 40 år konstateras 2 - 3 % av fallen och hos de som är yngre än 50 år konstateras ungefär 10 % av fallen (Järvinen m.fl. 2013).

Dödligheten i tjocktarmscancer varierar mycket beroende på i vilket skede canceren är vid operationstillfället. I Finland lever i medeltal ungefär 81% av patienterna ett år efter diagnos medan motsvarande siffra för fem år efter diagnos är 64%. Fallen av kolorektal cancer är färre i Finland än i övriga delar av Norden, men det är ändå den tredje vanligaste cancerformen i Finland efter bröstcancer och prostatacancer (Suomen syöpärekisteri 2016).

I hela världen är kolorektal cancer den fjärde vanligaste typen av cancerdiagnos, med en incidens på 19,7% år 2018. Gällande cancertypernas mortalitet ligger kolorektal cancer på en tredje plats, med cirka 881 000 estimerade dödsfall år 2018, efter lungcancer och bröstcancer (Bray m.fl. 2018). Beroende på var i världen man befinner sig ser incidensen för kolorektal cancer olika ut. Generellt sett är kolorektal cancer vanligare i länder med högre levnadsstandard och högre socioekonomisk utveckling. Störst är incidensen i delar av Europa, Australien och Nya Zeeland, Nordamerika och östra Asien. I de flesta delarna av Afrika och i södra Asien finns däremot några av de lägsta incidenserna för kolorektal cancer (Bray m.fl. 2018).

2.1.2 Typer av kolorektal cancer

Kolorektal cancer utvecklas under lång tid i tarmens slemhinna. Det kan ta många år före godartade adenom i tarmen utvecklas till cancer som följd av ytterligare tillväxt och

förändringar. De typer av kolorektal cancer som inte är ärftliga upptäcks oftast först efter 60 års ålder, men canceren har före det här kunnat utvecklas under 10–20 år (Carethers m.fl. 2015). Ungefär 95 % av fallen av kolorektal cancer är adenokarcinom, vilket innebär att tumörerna utvecklas från epitelceller och är körtelartade. Mucinäs karcinom, *engl. mucinous carcinom*, och adenoskvamöst karcinom, *engl. adenosquamous carcinom*, är två andra typer (WCRF 2017). Mucinäs karcinom är en cancertyp som uppstår i de celler som beklär den inre ytan av tarmen och producerar slem. Adenoskvamös karcinom är en cancertyp som innehåller två olika typer av celler, skvamösa platta celler och körtelliknande celler (National Cancer Institute 2018).

En del av fallen av kolorektal cancer har en genetisk bakgrund. Risken för att insjukna i kolorektal cancer kan i en del fall påverkas av samverkan mellan flera olika gener. Polypotiska ärftliga former av tjocktarmscancer är ett exempel på det här. Familjär adenomatös polypos (FAP) är en av dessa former. Vid denna sjukdom bildas först ofarliga växter i tjocktarmen som sedan kan utvecklas till cancertumörer. Det här är en ärftlig och kronisk sjukdom där man från början har en felaktig allel av tumör suppressorgen APC (Lynch m.fl. 2003). Om man därför under sin livstid får en mutation i den enda friska allelen eller genvarianten, kommer det att leda till att kolorektal cancer utvecklas. Vid FAP uppkommer kolorektal cancer oftast tidigare än den brukar, ofta redan runt 40 års ålder (Weitz m.fl. 2005).

Lynch syndrom eller hereditär nonpolyposis kolorektal cancer (HNPCC), *engl. hereditary non-polyposis colorectal cancer*, är en typ av mutation som ökar risken för många olika cancertyper, däribland kolorektal cancer. Lynch syndrom står för ungefär 1–5 % av fallen av kolorektal cancer. Det här är en icke-polypotisk form av kolorektal cancer som beror på felaktigheter i DNA-reparationsgenerna (MMR), *engl. mismatch repair genes* (Aaltonen m.fl. 1998). Mutationer i MMR generna kan göra en person mera utsatt för kolorektal cancer och även en del andra former av cancer (de la Chapelle m.fl. 1995). En person som har den här mutationen har t.ex. över 80% risk att få cancer före 75 års ålder (Vasen m.fl. 1996).

2.1.3 Bakomliggande orsaker

De bakomliggande orsakerna för tjocktarms- och ändtarmscancer eller kolorektal cancer kan vara både genetiska faktorer och livsstilsfaktorer. Man antar att ungefär två tredjedelar av kolorektal cancerfallen har sin bakgrund i faktorer som varken är ärftliga eller har att göra med

andra bakomliggande sjukdomar (Carethers m.fl. 2015). Dessa två tredjedelar består därmed av bland annat kost, miljö och övriga livsstilsfaktorer. I en undersökning från Storbritannien föreslår man till och med att nästan 45% av fallen kan ha en bakgrund i tre faktorer (alkohol, litet fiber, kött) som har att göra med kosten (Parkin m.fl. 2011). Rökning, övervikt/fetma och brist på fysisk aktivitet är tre andra livsstilsfaktorer som också har samband med ökad risk för kolorektal cancer (Parkin m.fl. 2011). Övervikt (speciellt bukfetma), rökning, alkohol och för litet fysisk aktivitet är även riskfaktorer som nämns i WCRFs rapport om kolorektal cancer (WCRF 2017). Tarmfloras sammansättning antas även spela en roll för utvecklingen av kolorektal cancer, men det är ännu oklart exakt hur stor dess roll är (Jahani-Sherafat m.fl. 2018). Även inflammatoriska tarmsjukdomar ökar risken för att insjukna i kolorektal cancer, såsom Crohns sjukdom och ulcerös kolit (Beaugerie m.fl. 2015, Eaden m.fl. 2001).

Gällande genetikens del i uppkomsten av kolorektal cancer, har man under den senaste tiden kunnat se att genfel som samlas i tarmens slemhinne-celler kan ha betydelse för uppkomsten (Järvinen m.fl. 2013). Genmutationer som kan öka risken för kolorektal cancer, kan även uppstå som en följd av olika livsstilsfaktorer. Sådana livsstilsfaktorer kan t.ex. gälla näringen. I epidemiologiska undersökningar har man fått fram resultat som tyder på att runt 30–70 % av fallen av kolorektal cancer kan bero på dieten (Miller m.fl. 2013). Speciellt en hög konsumtion av rött och processat kött anses öka risken (WCRF 2017).

2.1.4 Förebyggande av kolorektal cancer

För personer i riskgruppen rekommenderas screening med hjälp av kolonoskopi och för övriga immunologiskt blodtest av avföringen. Förutom de som har genetisk benägenhet att insjukna i kolorektal cancer, borde man följa upp sådana som utgående från avföringsprover kan ha en större risk att få kolorektal cancer. Detta kunde vara till nytta eftersom kolorektal cancer oftast framskrider långsamt och kan utvecklas från till en början ofarliga adenom. Man kunde även utföra screening för alla de som är i åldern 55–65 år, eftersom den största individuella och mest betydelsefulla riskfaktorn på befolkningsnivå för tjocktarmscancer är ålder (Mecklin m.fl. 2016). Genom att tillägna sig en hälsosam livsstil borde man även kunna förhindra uppkomsten av kolorektal cancer i viss mån. Det här inkluderar att man håller en hälsosam vikt, inte röker, motionerar regelbundet och undviker för stora mängder alkohol och rött och processat kött (WCRF 2017).

2.2 Kolorektal cancer och kost

Kosten ser ut att ha ett klart samband med risken för att insjukna i kolorektal cancer. I sin rapport om kolorektal cancer från 2017, konstaterade World Cancer Research Fund (WCRF) att processat kött och alkoholdrycker är de två livsmedel vars samband med kolorektal cancer är övertygande. Sambandet mellan konsumtionen av rött kött och kolorektal cancer anses även vara troligt (WCRF 2017). International Agency for Research on Cancer (IARC), en del av Världshälsoorganisationen (WHO), *engl. World Health Organization*, klassificerade också 2015 processat kött som en grupp 1 karcinogen (orsakar cancer) och rött kött som en grupp 2 karcinogen (orsakar troligtvis cancer) (Bouvard m.fl. 2015).

Det är troligt att fullkorn, livsmedel med ett högt fiberinnehåll, mjölkprodukter och tillskott av kalcium minskar risken för kolorektal cancer. Det finns även begränsade bevis för att fisk, livsmedel som innehåller vitamin C och vitamin D kan skydda mot utvecklingen. Bevisen är även begränsade för ett positivt samband mellan ett lågt intag av stärkelserika grönsaker, lågt intag av frukt och mat som innehåller hemjärn (WCRF 2017). I följande punkter kommer olika delar av kosten att behandlas för att klargöra kostens möjliga roll i utvecklingen av kolorektal cancer. Eftersom rött och processat kött är av central betydelse gällande den här avhandlingen kommer dessa att behandlas skilt i stycke 2.3.

2.2.1 Fjäderfä och fisk

Sambandet mellan konsumtionen av kyckling och kolorektal cancer har undersökts i många studier. En meta-analys med 23 studier visade på att det inte finns något samband mellan kött från fjäderfä och kolorektal cancer (Carr m.fl. 2016). I en prospektiv kohortstudie såg man inte heller att konsumtionen av vitt kött hade ett samband med en ökad risk för kolorektal cancer, istället observerade man ett svagt icke-betydelsefullt negativt samband (English m.fl. 2004). Ytterligare två andra prospektiva kohortstudier visade på inget samband mellan kött från fjäderfä och kolorektal cancer (Cross m.fl. 2010, Norat m.fl. 2005). Orsaken till att konsumtionen av fjäderfä ibland visar ett omvänt samband med risken att utveckla tjocktarmscancer, kan bero på att kött från fjäderfä innehåller en mindre mängd hemjärn än exempelvis rött kött. Därmed finns det i kyckling en mindre mängd hemjärn som kan främja bildningen av N-nitroso föreningar i tarmen (Bingham m.fl. 2002).

En annan orsak till bristen på samband kan vara att de som konsumerar mera vitt kött överlag har en hälsosammare kost och livsstil. Man har kunnat se att de som äter mera kött från fjäderfä även äter mera frukter, grönsaker, baljväxter, fettsnåla mjölkprodukter och fullkorn samt mindre rött kött och processat kött (Miller m.fl. 2013). Dessa personer kan även ha ett lägre BMI och vara mera fysiskt aktiva. Det här innebär att alla dessa faktorer kan ha en adderande positiv effekt på hälsan, vilket betyder att man inte kan dra slutsatsen att det omvända sambandet med kolorektal cancer endast beror på konsumtionen av vitt kött i sig (Miller m.fl. 2013).

Gällande fisk är det ännu oklart huruvida den har en skyddande effekt mot kolorektal cancer. I en stor prospektiv kohortstudie utförd i Europa med över 478 000 människor såg man att fisk har ett omvänt samband med kolorektal cancer (Norat m.fl. 2005). Men WCRF konstaterade ändå i sin rapport från 2017 att även om det finns möjliga mekanismer genom vilka fisk kan skydda mot kolorektal cancer, är bevisen för detta begränsade även om de är relativt konsistenta (WCRF 2017). En mekanism genom vilken fisk kan ha en skyddande effekt, kan vara fiskens höga innehåll av långkedjade n-3 polyomättade fettsyror. Sådana fettsyror är eikosapentaensyra och dokosapentaensyra och de förekommer främst i fet fisk. Dessa har i *in vitro* studier och djurstudier kunnat ses hämma utvecklingen av kolorektal cancer (Larsson m.fl. 2004).

2.2.2 Mjölksprodukter och kalcium

Till mjölkprodukter räknas förutom mjölkprodukter, såsom yoghurt och mjölk, även ost. Det är sannolikt att konsumtion av mjölkprodukter minskar risken för kolorektal cancer (Cho m.fl. 2004, WCRF 2017). Det här antas till stor del bero på mjölkprodukternas innehåll av kalcium. Bakterier som producerar mjölksyra kan även ha en skyddande effekt mot kolorektal cancer (Norat m.fl. 2003). Man antar att effekten av kalcium beror på att kalcium kan binda okonjugerade gallsyror och fria fettsyror och därmed minska deras skadliga effekt i tjocktarmen (Newmark m.fl. 1984). Andra mera moderna hypoteser gäller att kalcium genom att påverka olika cellsignaleringsvägar, kan minska cellförökning och öka celldifferentiering, vilket kan minska risken för cancer (Fedirko m.fl. 2009). Kalciumtillskott i sig själv skyddar antagligen också mot kolorektal cancer, i doser mellan 200 – 1000 mg per dag (WCRF 2017).

2.2.3 Frukt och grönsaker

Frukt innehåller en hel del föreningar som kan ha anti-tumor och antioxidativa effekter. De innehåller bl.a. mycket fiber, vitamin C, vitamin E, folat, flavonoider, polyfenoler och limonen (Lü m.fl. 2010). På grund av att en del av dessa föreningar kan fungera som antioxidanter, kan de skydda cellerna i tarmen från skador och reaktiva syreföreningar. Men bevisen gällande sambandet mellan frukt och kolorektal cancer är ändå begränsade. En meta-analys av kohortstudier rapporterade att det nog finns ett positivt samband men att detta inte är betydelsefullt (Huxley m.fl. 2009). Man har dock kunnat se ett icke linjärt dos-respons samband mellan konsumtionen av frukt och kolorektal cancer, vid låg konsumtion av frukt, under 100 g per dag (WCRF 2017).

Precis som med frukt innehåller grönsaker en hel del föreningar och ämnen som kan ha en skyddande effekt mot cancer. Sådana föreningar är t.ex. dietära fiber, karotenoider, vitamin C, vitamin E, selen, folat, flavonoider, fenoler, plantsteroler och limonen (Steinmetz m.fl. 1991). I de flesta studier har man ändå inte kunnat se ett klart omvänt samband mellan intag av varken frukt eller grönsaker och kolorektal cancer, vilket konstaterades bl.a. i en prospektiv studie (Leenders m.fl. 2015). WCRF konstaterar även i sin rapport om kolorektal cancer att det finns begränsade bevis för grönsakers samband med en minskad risk för kolorektal cancer, men det finns möjliga mekanismer som kan förklara ett eventuellt samband. Det finns även en del bevis för att ett lågt intag, mindre än 100 g/dag, av grönsaker med litet stärkelseinnehåll kan öka risken för kolorektal cancer (WCRF 2017).

2.2.4 Fiber

Fullkorn och livsmedel som innehåller dietära fibrer anses ha en skyddande effekt mot uppkomsten av kolorektal cancer (Aune m.fl. 2011, WCRF 2017). Fiber ökar avföringens massa och minskar tiden det tar för avföringen att transporteras genom tarmen (Song m.fl. 2015). Det här innebär att halten av skadliga metaboliter blir förhållandevis mindre och också att deras verkningstid eller kontakt med tarmväggarna minskar (Slavin m.fl. 2000). Fiber kan även ha en positiv inverkan via tarmfloran. Fiber hjälper till att upprätthålla en välmående tarmflora och kan orsaka förändringar i den, och därmed också indirekt påverka tarmmikroernas bildning av olika bioaktiva föreningar (Fung m.fl. 2012, Hamer m.fl. 2008). Sådana föreningar kan vara kortkedjade fettsyror såsom butyrat (Topping m.fl. 2001). Fiber kan även reglera det

glykemiska svaret och skydda mot insulinresistens och via den mekanismen ha en skyddande effekt mot kolorektal cancer (Pereira m.fl. 2002).

Speciellt bra ser fiber från sädesslagsprodukter ut att vara. Det här kan bero på att de förutom fiber även innehåller andra nyttiga föreningar, såsom polyfenoliska komponenter, folat, vitamin E, selen, koppar, zink, lignin och fytoestrogen som kan ha en skyddande effekt mot uppkomsten av tjocktarmscancer (Slavin 2000). Flera av dessa föreningar har antagligen i sig själv en antikarcinogen effekt och kan fungera som antioxidanter (WCRF 2017).

2.2.5 Plantbaserad kost

Huruvida en plantbaserad eller en helt vegetarisk diet påverkar förekomsten av kolorektal cancer har undersökts i ett antal studier. En sådan kost innehåller en större andel plantproteinkällor än en vanlig blandkost. I en populationsbaserad kohortstudie, undersökte man sambandet mellan kolorektal cancer och dieter med olika mängder kött (Gilsing m.fl. 2015). I den undersökningen såg man att vegetarianer, pesceterianer (utesluter kött och fågel) och de som åt kött 1 dag/vecka, hade en icke betydelsefull minskad risk för kolorektal cancer jämfört med de som åt kött 6–7 dagar/vecka. Denna skillnad berodde dock främst på andra skillnader mellan de olika dieterna och inte direkt på skillnaden i mängden kött. Det var främst intaget av fiber och sojaprodukter som inverkade på skillnaden i risken för kolorektal cancer (Gilsing m.fl. 2015). Soja har t.ex. i en undersökning kunnat ses minska mängden N-nitroso föreningar i avföringen (Hughes m.fl. 2002). Man kunde däremot se att en ersättning av 5 % av energin från köttproteiner med 5 % av energi från mjölkproteiner, hörde ihop med en 24 % minskning i risken för kolorektal cancer. Men ingen skillnad kunde ses om man ersatte proteiner från kött med proteiner från plantkällor, ägg eller fisk (Gilsing m.fl. 2015).

I en prospektiv studie från Storbritannien som utfördes under en period på 17 år med 10 998 människor, observerade man att vegetarianer hade en relativ risk på 0,85 för kolorektal cancer jämfört med icke-vegetarianer (Sanjoaquin m.fl. 2004). Den här skillnaden var ändå inte statistiskt betydelsefull. Man såg dock ingen skillnad i kolorektal cancer risk mellan icke-vegetarianerna, beroende på om de åt en mindre eller större mängd kött (Sanjoaquin m.fl. 2004). Även i en annan prospektiv kohortstudie från Nordamerika kunde man se att vegetarianer hade en relativ risk på 0,78 för kolorektal cancer jämfört med icke-vegetarianer (Orlich m.fl. 2015). I den här undersökningen hade gruppen med pescovegetarianer en relativ

risk på 0,57 jämfört med icke-vegetarianer. Den relativa risken för lakto-ovo vegetarianer var 0,82, för veganer 0,54 och för semivegetarianer 0,92 jämfört med icke-vegetarianer. Semivegetarianerna åt en vegetarisk diet som inkluderade kött (exklusive fisk) en eller flera gånger per månad och alla typer av kött (inklusive fisk) en eller flera gånger per månad men högst en gång per vecka eller mera sällan (Orlich m.fl. 2015).

Men alla studier har inte visat på en minskad risk för kolorektal cancer med en vegetarisk kost. I en prospektiv studie gjord i Storbritannien såg man tvärtom att risken för kolorektal cancer var högre bland vegetarianer jämfört med icke-vegetarianer (Key m.fl. 2009). Skillnaden var även statistiskt betydelsefull. Cancerförekomsten var dock låg i båda grupperna jämfört med medeltalet för hela befolkningen och deltagarna i undersökningen hade överlag en hälsosammare kost än resten av befolkningen (Key m.fl. 2009).

Även om det kan vara frånvaron av kött eller minskad konsumtion av kött som ger upphov till de här förändringarna, finns det också andra faktorer med en vegetarisk diet som kan inverka på risken. I en av studierna såg man att vegetarianer hade ett mindre intag av totalt fett och mättat fett och ett högre intag av fiber jämfört med icke-vegetarianer (Orlich m.fl. 2015). Man har också kunnat se att vegetarianer äter en mindre mängd förfinat spannmål, tillsatt fett, sötsaker, snacks och kaloririka drycker. De här är alla faktorer som också eventuellt kan bidra till den något minskade risken för kolorektal cancer som ibland kan ses med en plantbaserad diet (Orlich m.fl. 2014).

2.3 Kolorektal cancer och rött och processat kött

Ett samband mellan en ökad risk för änd- och tjocktarmscancer och konsumtion av rött- eller processat kött har man sett i många undersökningar (Norat m.fl. 2005). Med rött kött avser man sådant muskelkött från däggdjur som är rött till färgen då det är rått, på grund av dess höga innehåll av myoglobin (Jeyakumar m.fl. 2017). Till rött kött räknas därmed t.ex. nötkött, getkött, griskött och lammkött. Processat kött är sådant kött som bearbetats genom t.ex. rökning, saltning eller konservering (Bouvard m.fl. 2015). Rött och processat kött är rikt på hemjärn, proteiner och fett (Tricker m.fl. 1991). WCRF konstaterar att sambandet mellan rött kött och kolorektal cancer är troligt (WCRF 2017) och IARC grupperar rött kött som en grupp 2 karcinogen (orsakar troligtvis cancer) (Bouvard m.fl. 2015). Det processade köttets samband

med kolorektal cancer klassificeras som övertygande av WCRF, och IARC grupperar det även som en grupp 1 karcinogen (orsakar cancer).

I en prospektiv studie med 478 000 människor från Europa såg man att kolorektal cancerrisk hade ett positivt samband med en högre konsumtion av rött och processat kött (Norat m.fl. 2005). Gruppen med högst intag av rött och processat kött konsumerade >160 g/dag och gruppen med minst intag <20 g/dag (Norat m.fl. 2005). I meta-analyser av prospektiva studier, har man kunnat se att en hög konsumtionen av rött och processat kött har ett samband med ökad risk för kolorektal cancer (Chan m.fl. 2011, Larsson m.fl. 2006). Även i epidemiologiska studier har samma trend för en ökad kolorektal cancerrisk kunnat ses (Aune m.fl. 2013). I flera meta-analyser har man t.ex. kunnat se att varje ökning av 100 g rött kött per dag och 50 g processat kött per dag, ökar risken för tjocktarms- och ändtarmscancer med ungefär 20 % (Chan m.fl. 2011, Xu m.fl. 2013). Orsakerna till varför rött kött och processat kött ser ut att ha ett samband med änd- och tjocktarmscancer är ännu inte helt klara.

2.3.1 Hemjärn i rött kött

En orsak till det röda köttets samband med änd- och tjocktarmscancer kan vara dess höga innehåll av hemjärn jämfört med andra typer av kött. Samband mellan ett högt intag av hemjärn och kolorektal cancer har setts (Bastide m.fl. 2011) i flera meta-analyser (Qiao m.fl. 2013). Även om ett samband kan ses är mekanismerna bakom sambandet ännu litet klara.

En förklaring kan vara att ett högt intag av hemjärn kan öka bildningen av reaktiva syreföreningar i tarmen, genom att hem fungerar som en katalysator i reaktioner som ger upphov till reaktiva syreföreningar (Padmanabhan m.fl. 2015). Genom denna mekanism kan hemjärn bidra till ökad lipidperoxidation och skador i celler och DNA, vilka kan vara riskfaktorer för utvecklingen av kolorektal cancer. Hemjärn kan även öka bildningen av endogena N-nitroso föreningar i tjocktarmen genom att fungera som en katalysator för bildningen, vilket också kan öka risken för kolorektal cancer (Cross m.fl. 2003).

Metabolismen av hem i tarmen kan även vara cytotoxisk, vilket innebär att det bildas en giftig miljö för cellerna (Jeyakumar m.fl. 2017). På grund av den cytotoxiska omgivningen kan cellerna i tarmens epitel skadas och därmed kan risken för cancer öka. Mycket av bevisen gällande den här cytotoxiska effekten baseras ännu endast på experimentella test utförda på

djur, det behövs därför undersökningar på människor för att kunna dra några slutsatser (Jeyakumar m.fl. 2017).

2.3.2 HCA och PAH föreningar

En annan orsak till det röda och processade köttets samband med kolorektal cancer, kan vara att det vid tillagning av kött vid höga temperaturer uppstår mutagena och carcinogena föreningar. Sådana föreningar är heterocykliska aminer (HCA) och polycykliska aromatiska kolväten (PAH) (Chiavaraini m.fl. 2017). Man har kunnat se att de här föreningarna har ett samband med kolorektal cancer i epidemiologiska undersökningar (Cross m.fl. 2010) och fall-kontroll studier (Barbir m.fl. 2012). Även i djurstudier har samband observerats, även om de nivåer av föreningarna som används i djurmodeller ofta är mycket högre än de som människor normalt får i sig (Cross m.fl. 2004).

Det finns många olika typer av både HCA och PAH föreningar. IARC klassar åtta typer av HCA föreningar som grupp 2A karcinogener, vilket innebär att de antagligen orsakar cancer hos människan (IARC 2016). Även om det finns mycket bevis som tyder på att de kan orsaka cancer är alla bevis inte konsistenta. IARC klassificerar en PAH förening, benso[a]pyren (BaP), som en grupp 1 karcinogen, vilket betyder att den är en karcinogen för människan. Tre PAH föreningar klassas som grupp 2A karcinogener (antagligen carcinogena för människan) och tolv som grupp 2B (möjligen carcinogena för människan) karcinogener (IARC 2016).

HCA är föreningar som bildas vid höga temperaturer från de aminosyror, sockerarter och kreatin som finns i kött. Mest HCA ser ut att bildas vid temperaturer över 150 grader Celsius och främst vid grillning eller stekning i panna (Cross m.fl. 2004). I en fall-kontrollstudie kunde man t.ex. se ett samband mellan pannfriterad biffstek och kolorektal cancer, även om man inte såg något samband mellan konsumtionen av icke-processat eller processat rött kött (Joshi m.fl. 2015). HCA kan utöva sin effekt genom att ge upphov till DNA-addukter eller mutationer. DNA-addukter är föreningar som är kovalent bundna till bitar av DNA, de här uppstår ofta som en följd av att DNA exponerats för en karcinogen förening (Santarelli m.fl. 2008). DNA-addukter kan leda till att en cell utvecklas till en cancercell om reparation inte sker (Rajalakshmi m.fl. 2015).

Flera faktorer påverkar bildningen av HCA föreningar vid tillagning, t.ex. typen av kött som tillagas, tillagningstid, temperatur samt koncentrationen av prekursorer till HCA och halten av

fett och vatten (Cross m.fl. 2004). PAH föreningar bildas å sin sida då fett och juicer från kött som tillagas droppar ner på en öppen låga och därefter fastnar på köttets yta. Också vid rökning och konservering av kött kan PAH bildas (Cross m.fl. 2004). Man bör dock komma ihåg att HCA och PAH föreningar inte exklusivt bildas i rött kött, utan de bildas även vid tillagningen av fisk och fjäderfä (Sugimura 2000).

2.3.4 N-nitroso föreningar

N-nitroso föreningar kan vara ytterligare en orsak till sambandet mellan rött och processat kött och kolorektal cancer. N-nitroso föreningar kan bildas i processat kött. Processat kött innehåller rikligt med nitriter, aminer och amider som behövs för bildningen av N-nitroso föreningar (Tricker m.fl. 1991). Processat kött är en exogen källa till N-nitroso föreningar för människan. Men N-nitroso föreningar kan även bildas endogent, vilket innebär att de bildas inuti människokroppen. Endogent bildas N-nitroso föreningar genom att aminer och amider som bildats från nedbrytningen av proteiner, reagerar med nitroso agenser som härstammar från nitriter (Dunrow m.fl. 2010). Hemjärn antas främja den endogena bildningen av N-nitroso föreningar (Cross m.fl. 2004). Rött kött innehåller både mycket proteiner och hemjärn som kan bidra till bildningen (Tricker m.fl. 1991).

N-nitroso föreningars metaboliter kan orsaka mutationer i cellernas DNA (Alfadda m.fl. 2012). N-nitrosoföreningar har setts vara potenta karcinogener i djur (Tricker m.fl. 1991) och också i experimentella studier (Alfadda m.fl. 2012). Även epidemiologiska studier (Loh m.fl. 2011) och fall-kontrollstudier har visat på samband mellan N-nitroso föreningar och kolorektal cancer (Zhu m.fl. 2014).

2.3.5 N-glykolyl-neuraminsyra

En relativt ny upptäckt är att också en kiseldioxid syra med namnet N-glykolyl-neuraminsyra (Neu5Gc), *engl. N-glycolylneuraminic acid*, kan ha ett samband med utvecklingen av kolorektal cancer (Samraj m.fl. 2015). Neu5Gc finns i mjölk från nötkreatur och i däggdjur såsom gris, lamm och biffdjur, däremot finns den knappt alls i kyckling eller fisk (Chou m.fl. 1998). Neu5Gc syntetiseras inte av människan och därför kan inte människans immunförsvar känna igen den. Neu5Gc behandlas därför som en främmande molekyl i människokroppen, vilket ger upphov till en reaktion av immunförsvaret. Man tror att Neu5Gc antikropparna kan främja ett tillstånd av kronisk inflammation i kroppen, vilket kan vara en riskfaktor för cancer (Samraj m.fl. 2015).

Även om det finns en del bevis gällande ämnet behövs det mera forskning, speciellt epidemiologisk, för att kunna dra några slutsatser.

2.4 N-nitroso föreningar

2.4.1 Definition och typer

N-nitroso föreningar, *engl. N-nitroso compounds (NOC)*, är karcinogena föreningar som kan orsaka mutationer i DNA. De två vanligaste typerna av NOC är nitrosaminer och nitrosamider (Lijinsky 1999). Nitrosoguanidiner är också en typ av N-nitroso föreningar. I processat kött har man identifierat förekomsten av de flyktiga N-nitroso föreningarna N-nitrosodimetylamin (NDMA) och N-nitrosodietylamin (Zhu m.fl. 2014). NDMA är en nitrosamin som förekommer rätt allmänt i processat kött (Jakszyn m.fl. 2006). Processat kött innehåller rikligt med nitrit, aminer och amider som behövs för bildningen av N-nitroso föreningar (Tricker m.fl. 1991).

2.4.2 Bildning

Proteinkällorna i vår kost består av proteiner som i sin tur är uppbyggda av aminer och amider. Nitrosaminer och nitrosamider bildas genom att aminer eller amider reagerar med nitroserande agenser som härstammar från nitriter (Dunrow m.fl. 2010). De här amiderna och aminerna kan därmed bli N-nitroserade. Bildningen av N-nitroso föreningar kan vara antingen exogen eller endogen. Vid exogen bildning bildas N-nitroso föreningarna utanför människokroppen, medan de vid endogen bildning bildas inuti människokroppen (Cross m.fl. 2004).

Den exogena bildningen av N-nitroso föreningar kan ske i olika typer av processade köttprodukter (Cross m.fl. 2004). Sodium nitriter används som tillsatser i en del processade köttprodukter. De här nitriterna kan reagera med aminer och amider från proteiner som det också finns rikligt av i köttprodukter och på så sätt bilda N-nitrosoföreningar (Tricker m.fl. 1991). För att förhindra den exogena bildningen av N-nitroso föreningar i processade köttprodukter tillsätts ibland askorbinsyra (Cross m.fl. 2004).

Den endogena bildningen av N-nitroso föreningar som sker inuti kroppen, kan ske på flera olika sätt. Största delen av de N-nitroso föreningar som en människa utsetts för, ser ut att bildas endogent (Silvester m.fl. 1997). Man har uppskattat att omkring 45–75 % av den totala

exponeringen är endogen (Tricker 1997). Vid endogen bildning kan föreningarna bildas genom syra katalysering eller genom reaktioner som underlättas av bakterier eller celler (Cross m.fl. 2004). Aminer och amider finns tillgängliga i tjocktarmen från den dekarboxylering av aminosyror som bakterierna utfört (Cross m.fl. 2004). Nitriter kan härstamma från olika typer av processade köttprodukter. Andra källor till nitrit är en del spannmålsprodukter och grönsaker, medan nitrat förekommer i gröna bladgrönsaker och en del grönsaker (IARC 2006).

Katalysering med syra ser ut att ske främst i magsäcken där pH är lågt. I magsäcken finns saltsyra (HCl) som är en nitroserande agens. Bildningen av N-nitroso föreningar i magsäcken antas dock vara väldigt liten (Pignatelli m.fl. 1993). Cellförmedlad katalys sker genom produktion av kväveoxid. Den här typen av bildning är också ovanlig i och med att den främst sker vid tillstånd av kronisk inflammation eller infektion. Därför är det troligt att största delen av bildningen av N-nitroso föreningar sker genom kemisk eller bakteriell katalys (Cross m.fl. 2004). Även om det finns resultat som visar på att all bildning av N-nitroso föreningar ändå inte sker genom bakteriell katalys (Lunn m.fl. 2007). Nitrat reduktas och nitrit reduktas är två bakterie enzymer som kan delta i bakteriell katalys. I djurtest har man kunnat se att det behövs en normal tarmflora för att N-nitroso föreningar skall kunna bildas, vilket visar på tarmfloras betydelse i bildningen av N-nitroso föreningar (Massey m.fl. 1988). Bakterier i munhålan eller tarmen kan även omvandla nitrat till nitrit och på så sätt kan även nitrat främja bildningen av N-nitroso föreningar (IARC 2006).

Nitrosylhem och nitrosotioler är två typer av nitroso komponenter som kan öka den dietinducerade endogena bildningen av N-nitroso föreningar, genom att fungera som donatorer av NO-grupper (Kuhnle m.fl. 2007). Nitrosotioler bildas under sura förhållanden i magsäcken och kan därifrån transporteras vidare till tunn- och tjocktarmen (Williams 2004). Nitrosation av tiol-grupper kan främjas av hem. I tarmen kan dessa nitrosotiol föreningar ge bort en NO-grupp och därmed främja bildningen av N-nitrosoföreningar i tjocktarmens epitel (Kuhnle m.fl. 2007). I tarmen förekommer S-nitrosotioler även naturligt och dessa kan också ge en NO-grupp åt hem (Richardson m.fl. 2002).

Hem kan lätt nitrosyleras och bli en nitroserande agens som därmed kan främja bildningen av N-nitroso föreningar (Cross m.fl. 2007). Nitrosation av hem sker oftast under anaeroba förhållanden, vilket innebär att bildningen äger rum i tunntarmen eller längre förbi denna (Kuhnle m.fl. 2004). I tunntarmen och tjocktarmen är omgivningen även mera reaktiv och

basisk, vilket antagligen passar bildningen av nitrosylhem och andra nitroso föreningar bättre (Williams 2004). Den här miljön underlättar hems nitrosylering av NO-grupper eller nitriter. Precis som nitrosotioler kan nitrosylhem ge bort sin NO-grupp och främja bildningen av N-nitrosoföreningar. Hemoglobin eller myoglobin kan även reagera med nitrit och bilda N-nitrosohaemoglobin respektive N-nitrosomyoglobin (Bonnett m.fl. 1975). NO kan även reagera direkt med hemoglobin och myoglobin för att bilda N-nitroso föreningar (Wade m.fl. 1990). N-nitrosoföreningar kan även bildas exogent från hemjärn i processade köttprodukter, eftersom där finns mycket nitriter som kan reagera med hemjärnet (Santarelli m.fl. 2008).

2.4.3 Samband med kolorektal cancer

N-nitrosoföreningar har setts vara potenta carcinogener i djur (Tricker m.fl. 1991). I experimentella studier med djur har man har kunnat se att både nitrosaminer och nitrosamider kan ge upphov till metaboliter som kan ge skador på DNA, och genom denna mekanism öka risken för kolorektal cancer (Alfadda m.fl. 2012). Sådana metaboliter kan vara aldehyder och alkyl diazonium joner som kan orsaka cellskador (Bartsch m.fl. 1988). N-alkyl-N-nitroso komponenter kan orsaka alkylering av DNA, vilket kan inducera GC → AT basparsförflyttningar i gener som har setts vara muterade i kolorektal cancer, såsom RAS. En mutation i RAS gener kan göra dem till onkogener. Onkogener är gener som genom olika mekanismer kan leda till utvecklingen av cancer (Bos 1989).

De N-nitrosoföreningar som bildas kan också orsaka DNA-addukter, vilket är cancerframkallande föreningar som är bundna till bitar av DNA (Santarelli m.fl. 2008). Nitrosation av aminosyran glycin kan leda till bildningen av diazoacetat (Cupid m.fl. 2004). Det här kan i sin tur leda till att O6CMeG, *engl. O6-carboxymethyl-2'-deoxy-guanosine*, bildas. O6CMeG är en addukt specifik för N-nitroso föreningar. Man har kunnat se att mängden O6CMeG ökar i koloncellerna hos sådana människor som ätit rött kött (Lewin m.fl. 2006). Aminosyror som nitroserats kan därför vara en möjlig länk mellan kolorektal cancer och konsumtionen av rött kött. Eftersom nitrosylhem kan ge bort sin NO-grupp, kan också de förhöjda halterna av NO i avföringen vara en mekanism genom vilken rött kött kan öka risken för kolorektal cancer (Rao 2004).

Även epidemiologiska studier (Loh m.fl. 2011) och fall-kontrollstudier har visat på samband mellan N-nitroso föreningar och kolorektal cancer (Zhu m.fl. 2014). Ett högt intag av NDMA

har visat sig speciellt ha ett samband med rektal cancer (Zhu m.fl. 2014) och även med kolorektal cancer i helhet (Knekt m.fl. 1999). Det här kan bero på att avföringens koncentration av N-nitrosoföreningar är högre då avföringen når rektum. Bevisen är dock mera begränsade gällande människor jämfört med djur (Zhu m.fl. 2014). N-nitrosoföreningar klassas som en klass 2A karcinogen av IARC, vilket innebär att de antagligen är karcinogena för människan (IARC 2006).

Nitrat förekommer som tidigare nämnts i gröna bladgrönsaker och en del andra grönsaker. Men sambandet mellan sådana grönsaker och kolorektal cancer ser ändå inte ut att finnas. I en fall-kontroll studie noterade man att ett högt intag av nitrater från grönsaker hade ett omvänt samband med kolorektal cancer (Espejo-Herrera m.fl. 2016). En orsak till det här kan vara att det i grönsaker också kan finnas föreningar som kan inhibera nitrosation eller att nitrater från grönsaker kan ha andra positiva effekter (Hord m.fl. 2009). Ett direkt samband mellan kolorektal cancer och konsumtion av nitrater och nitriter har inte heller setts i flera andra undersökningar (Knekt m.fl. 1999, Loh m.fl. 2011). Det finns en möjlighet att vitamin E och vitamin C, som det finns rikligt av i en del frukter och grönsaker, kan minska den endogena syntetiseringen av N-nitroso föreningar (Loh m.fl. 2011). Det här på grund av att de kan dämpa de fria radikalernas reaktioner med nitrit och därmed minska syntetiseringen av N-nitroso föreningar (Kalus m.fl. 1980).

2.4.4 N-nitroso föreningar i avföringen

Man har kunnat se att halten av N-nitroso föreningar i avföringen stiger efter konsumtion av en diet med ett högt innehåll av rött kött (600 g/dag) jämfört en diet med lågt innehåll av rött kött (60 g/dag) (Bingham m.fl. 1996). Rött och processat kött får till stånd en dos-beroende ökning av N-nitroso föreningar i avföringen (Hughes m.fl. 2001, Kuhnle m.fl. 2007). Däremot har inte samma sak observerats för vitt kött, såsom kyckling och fisk (Norat m.fl. 2005).

Då man har jämfört halten av N-nitroso föreningar i avföringen hos människor på en diet med mycket rött kött och de som ätit vegetariskt, har man sett att halterna av nitrosylhem och nitrosotioler varit betydligt högre i avföringen hos de som ätit en diet med mycket rött kött (Kuhnle m.fl. 2007). Samma sak har också observerats i en annan studie, även om mängden testpersoner ($n = 10-20$) i båda studierna varit låg (Joosen m.fl. 2009, Kuhnle m.fl. 2007). I en studie såg man också att halten av N-nitroso föreningar i avföringen var högre hos de som åt

en diet med mycket rött kött jämfört med de som åt en diet med litet rött kött (Cross m.fl. 2003). Däremot var halten av N-nitroso föreningar inte högre om man istället åt en motsvarande mängd proteiner från plantkällor. Det fanns inte heller någon betydelsefull skillnad i halten av N-nitroso föreningar mellan en diet låg på rött kött och en vegetarisk diet (Cross m.fl. 2003).

Hem kan som tidigare nämnts lätt nitroseras i tarmen och därmed främja bildningen av N-nitroso föreningar. I en studie såg man att halten av N-nitroso föreningar i avföringen var högre hos sådana testpersoner som tilldelats hemjärn jämfört med de som tilldelats oorganiskt järn (Cross m.fl. 2003). Hemjärnets betydelse i bildningen av N-nitroso föreningar har kunnat ses i och med att koncentrationen av nitrosylhem var betydelsefullt högre än nitrosotiol i avföringen i en undersökning. Det röda köttets höga innehåll av hemjärn ansågs vara den främsta orsaken till den ökade bildningen av N-nitroso föreningar (Kuhnle m.fl. 2007).

3. UNDERSÖKNINGENS MÅL

Undersökningens mål är att undersöka vilken effekt en ersättning av djurproteinkällor med olika stora andelar av plantproteinkällor, har på halten av N-nitroso föreningar i avföringen hos friska människor. Det här är av betydelse eftersom N-nitroso föreningar har ett potentiellt samband med kolorektal cancer (IARC 2006). En kost rik på rött och processat kött har kunnat ses öka bildningen av N-nitroso föreningar (Hughes m.fl. 2001, Kuhnle m.fl. 2007). Processat kött anses också övertygande samband med kolorektal cancer och rött kött anses ha ett troligt samband (WCRF 2017). Kolorektal cancer är den tredje vanligaste formen av cancer i Finland (Suomen syöpärekisteri 2016) och den fjärde vanligaste i hela världen (Bray m.fl. 2018), vilket gör detta till ett betydelsefullt och aktuellt ämne. Därför är det viktigt att ha tillgång till information om metoder genom vilka man kan minska risken för denna vanliga typ av cancer.

Som tidigare nämnts har flera studier visat att en mindre mängd rött och processat kött i kosten lett till att också halten av N-nitroso föreningar i avföringen sjunkit. Hypotesen för den här undersökningen är därför att halten av N-nitroso föreningar i avföringen kommer att vara mindre hos de som ätit en kost där man ersatt en del av djurproteinkällorna med plantproteinkällor. Den här undersökningen består av en större mängd antal deltagare och utfördes under en längre tidsperiod, jämfört med många av de tidigare gjorda undersökningar som tangerat samma ämne, vilket är betydelsefullt.

Vår undersökning söker även svar på om minskningen av N-nitroso föreningar i avföringen endast kan ses om man ersätter en stor del av plantproteinerna med djurproteiner i kosten, eller om en minskning av N-nitroso föreningar också kan ses redan då man ersätter en mindre andel djurproteiner med plantproteiner. Målet är att se om redan mindre förändringar i kostens proteinkällor kan leda till betydelsefulla resultat i minskningen av mängden N-nitroso föreningar i avföringen. Den här undersökningen är även speciell i och med att den fokuserar på mängden djurproteiner i helhet och inte specifikt på rött och processat kött som många tidigare undersökningar gjort. Undersökningen kan bidra med information om hur man med enkla medel kan få till stånd en mindre mängd N-nitroso föreningar i avföringen och därmed minska sin risk för kolorektal cancer, vilket är en mycket vanlig form av cancer.

4. MATERIAL

4.1 Typ av undersökning

Materialet till den här pro gradu avhandlingen kommer från undersökningen ScenoProt. ScenoProt (*engl. Novel protein sources for food security*) är ett projekt som koordineras av Naturresursinstitutet Luke (*fin. Luonnonvarakeskus*) i Finland. I projektet är flera universitet och andra institutioner med, däribland Helsingfors universitet. Projektet hör i sin tur till den strategiska undersökningens ”Ett klimatneutralt och resurssnålt Finland” undersökningsprogram.

I den del av ScenoProt som utförs vid Helsingfors universitet, undersöker man vilken påverkan en ersättning av djurproteinkällor med plantproteinkällor i kosten har på olika markörer för hälsa. Interventionsperioden utfördes vid avdelningen för näringslära på Helsingfors universitet under vintern och våren 2017. Undersökningen var en kontrollerad klinisk interventionsstudie med frivilliga och friska människor. Den utfördes med en parallell design och på ett randomiserat vis. Undersökningens interventionsperiod pågick under 12 veckor. Målet var att jämföra effekterna av djurbaserade- och plantbaserade proteinkällors effekt på tarmkanalens metabolism och på markörer för kolorektal cancer samt på blodprotein metaboliter och markörer för typ 2 diabetes. All den mat som delades ut till deltagarna i undersökningen hade donerats till undersökningen av finländska livsmedelsföretag. De företag som donerade mat var Apetit Ruoka Oy, Arolan tila, Atria Suomi Oy, Fazer, Gold & Green Foods Ltd Oy, HKScan Finland Oy, Lantmännen Unibake International, Mauste-Sallinen Oy, Meira Oy och Oy Soya Ab (Jalofoods).

4.2 Undersökningsdeltagare

Deltagare till undersökningen rekryterades genom en annons i Helsingin sanomat, via Helsingfors universitets webbsida, e-postmeddelande som skickades ut via universitetets e-postlista åt studerande och anställda och man informerade även om undersökningen under föreläsningar vid universitetet. För att delta i undersökningen behövde man vara frisk, rökfri, 20–69 år och beredd att följa testdieten under 12 veckors tid. Uteslutningskriterierna för deltagarna var ett BMI under 18,5 kg/m² eller över 35 kg/m², strikt veganism, allvarliga matallergier, oral medicinering för någon allergi, regelbunden användning av fiskolja eller andra kosttillskott, extremsporter, inflammatorisk tarmsjukdom, irriterat kolon, celiaki, någon

typ av cancer inom de 5 senaste åren, fortgående användning av antibiotika eller mindre än tre månader sedan avslutad antibiotikakur, typ 1 eller 2 diabetes, hormon-, lever- eller njursjukdom, amning och graviditet.

Man hade som mål att rekrytera 50 personer till varje undersökningsgrupp, 150 undersökningsdeltagare totalt. Genom effektberäkning hade man räknat ut att den här mängden borde räcka för att visa på förändringar i halterna av hembaserade kväveföreningar orsakade av testdieter. Den här beräkningen gjordes baserat på materialet från KarniMari-undersökningen 2015. I den undersökningen var de hembaserade föreningarnas mängd i början av undersökningen $57,5 \pm 56,0$ pmol/100 µl avföringshomogenat och i undersökningens slutskede $44,9 \pm 22,5$ pmol/100 µl avföringshomogenat. Effektberäkningen visade att 50 deltagare/grupp räcker för att visa på en förändring mellan interventionens inledande skede och slutskede med konfidensintervallet 95 % och med den statistiska effekten 0,80. Med stöd av undersöknings uppställning borde den här gruppstorleken också vara tillräckligt stor för att visa på skillnader mellan grupperna.

4.3 Testdieter

I undersökningen tilldelades deltagarna slumpmässigt en av tre dieter som skiljde sig åt i fråga om andelen proteiner från djurkällor och plantkällor. De tre dieterna hade olika källor för kostens proteiner. Den första dietens proteiner bestod av 30 % plantproteiner och 70 % djurproteiner, vilket motsvarar en typisk finländsk kost. Den andra dietens proteiner bestod av 50 % plantproteiner och 50 % djurproteiner och den tredje dietens proteiner bestod av 70 % plantproteiner och 30 % djurproteiner. Det här innebar att grupp 1 hade ett beräknat intag av rött kött på 450 g/vecka och korv och charkuterivaror på 245 g/vecka, grupp 2 hade ett beräknat intag av rött kött på 300 g/vecka och korv och charkuterivaror på 160 g/vecka och grupp 3 hade ett beräknat intag av rött kött på 145 g/vecka och korv och charkuterivaror på 80 g/vecka.

I bild 1 åskådliggörs de olika dieternas sammansättning i fråga om proteiner och vilka de olika källorna till protein var. Alla dieter innehöll samma mängd fisk, två måltider per vecka, och man strävade även efter att de skulle innehålla samma mängd ägg, fyra ägg per vecka. Målet med mängden protein i dieterna var att det skulle hålla sig runt det finländska medelintaget av protein (17 E%) (FinRavinto 2012) och rekommendationen (10–20 E%) i de finländska

näringsrekommendationerna (VRN 2014). Gällande fett och kolhydrater kan det finnas skillnader i intaget mellan dieterna, eftersom växtbaserade produkter också ofta är t.ex. fiberkällor.

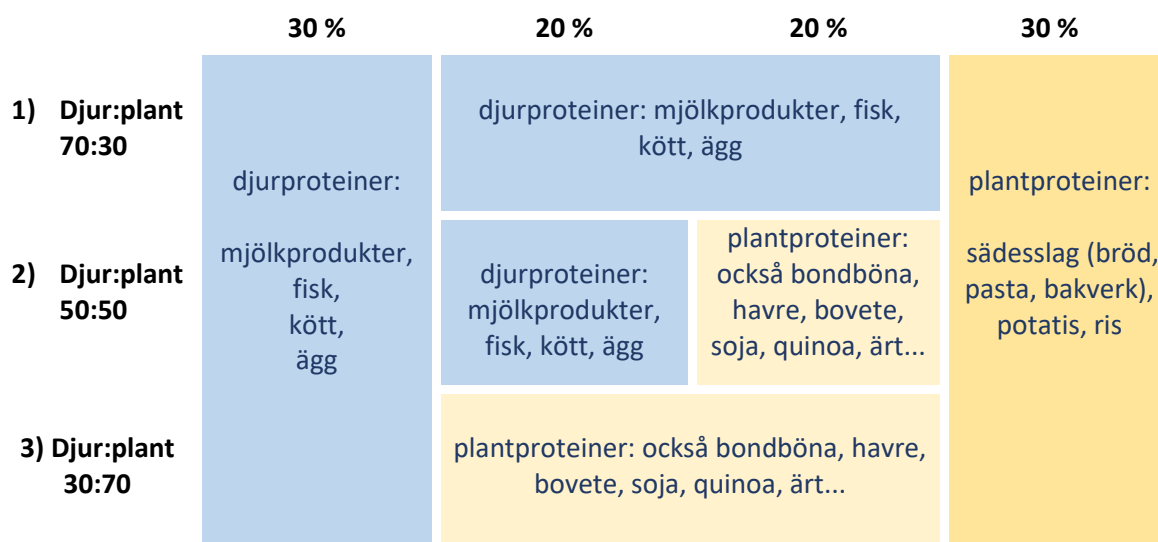


BILD 1. Testdiaternas sammansättning av protein från olika typer av källor.

Dieterna beskrevs åt testdeltagarna så att alla centrala proteinkällor var med på en födoämnesnivå. Man beskrev t.ex. hur många gånger per vecka man borde konsumera kycklingrätter, korvrätter, helkötsrätter, växtproteinrätter och så vidare, beroende på till vilken dietgrupp deltagaren tillhörde. Dieterna var alltså inte en hel kost eftersom sådana livsmedel som inte hade betydelse för proteininnehållet lämnades bort i beskrivningen.

Undersökingsdeltagarna uppmanades att fortsätta använda samma sort och mängd fett till brödpålägg och matlagning som tidigare. Grönsaker, frukter och bär fick de också använda som de tidigare gjort, förutom baljväxter som de fick från undersökningen. Också söta bakverk, sötsaker, chips, snacks och alkohol kunde de använda som tidigare. Sådana sötsaker och efterrätter (t.ex. glass och vaniljsås) som innehöll mjölk eller mjölkprodukter uppmanades de räkna som flytande mjölkprodukter. Mängden mjölkprodukter i dieten skiljde sig åt mellan grupperna, grupp 1 fick konsumera 4 dl/dag, grupp 2 fick 2,5 dl/dag och grupp 3 fick 1,25 dl/dag. Mängden ost som fick konsumeras var 40 g/dag för grupp 1, 25 g/dag för grupp 2 och

10–15 g/dag för grupp 3. Om deltagarna hade svårt att hålla sig inom den dagliga begränsningen för konsumtion av mjölkprodukter uppmanades de använda motsvarande plantbaserade produkter. Deltagarna fick inte äta mera fiskmåltider eller fiskprodukter än de som de fick via undersökningen.

Testpersonerna följde en av dieterna under 12 veckors tid och fick varje vecka två väskor bestående av olika livsmedel med sig hem. Livsmedlen de fick med sig hem var sådana som är centrala proteinkällor i den finländska kosten. De livsmedel de tilldelades var t.ex. råvaror som snabbt kan tillredas till mat (t.ex. malet kött, broiler- eller grisfilé, färdigmat (soppor, färdigmatsportioner, grönsaksbiffar), Härkis (ett växtproteinpreparat framställt av bondbönor), pulled havre, tofu, charkuterivaror, spannmålsprodukter (mysli, bröd, gröttingredienser), ärtkross, nötter, mandlar, frön och plantbaserade drycker. Deltagarna fick alla de proteinkällor som kosten skulle innehålla med sig hem, förutom mjölk, yoghurt, andra flytande mjölkprodukter, ost och ägg, dessa skulle de skaffa själva.

Man uppmanade deltagarna att konsumera alla livsmedel de fått före nästa besök på undersökningsenheten, vilket innebar att alla livsmedel skulle ätas upp under en vecka. Mängden livsmedel som delades ut hade räknats ut baserat på det genomsnittliga energibehovet för en vuxen. Om någon deltagare därför hade ett mindre eller större energibehov kunde de välja att äta mera eller mindre. I sådana fall uppmanades deltagarna att konsumera litet mindre/litet mera av alla typer av livsmedel, inte endast av en typ av livsmedel, så att deras intag av olika typer av livsmedel ändå är proportionellt likadant som de andra deltagarnas intag.

4.4 Insamlat material

Blodprov, urinprov och avföringsprov samlades in både före interventionsperioden och under interventionsperiodens sista vecka. Också mått gällande fenotypen såsom vikt, längd, blodtryck och kroppssammansättning samlades in före och i slutet av interventionen. Meningen var att vikten under undersökningens gång skulle hållas jämn, därför vägdes deltagarna under besöken som skedde en gång per vecka. Information om matintaget samlades in genom att deltagarna fick fylla i en matdagbok under fyra dagars tid, tre vardagar och en helgdag, före interventionsperioden, under en dag per tre veckor under dess tid och fyra dagar under interventionsperiodens sista vecka.

5. METODER

5.1 Avföringsprov

5.1.1 Insamling av avföringsprov

För analysen av N-nitroso föreningar användes de avföringsprov som testdeltagarna hade samlat in före och i slutet av interventionsperioden. Före testdieten började och under testdietens sista vecka uppmanades deltagarna att samla in tre avföringsprov från olika dagar under en och samma vecka. All avföring under den dag som ett prov samlades in vägdes och vikten antecknades. Men prov togs endast från ett av dagens avföringstillfällen, oftast det första under dagen och det med den största massan, även om det under dagen för insamlingen kunde vara flera avföringstillfällen. Provet samlades in på en rondsål och vägdes, deltagarna utvärderade även avföringens typ på Bristol-skalan från 1–7 (se bilaga 1). Avföringen fördelades sedan mellan två burkar och märktes ut med 1, 2 eller 3 beroende på från vilken av de tre dagarna som provet tagits.

Deltagarna uppmanades fylla ungefär 1/3 av en lockförsedd plastburk med avföring med hjälp av en engångssked. Efter detta märktes burken med på förhand gjorda klisterlappar och datumet då provet togs skrevs på klisterlappen. Burkarna lades sedan i en minigrip påse med deltagarens namn på och frystes genast ned. Deltagarna instruerades att under inga omständigheter låta avföringsproverna smälta efter att de hade frysts ned. Burkarna förvarades nedfrysta till de togs med till undersökningsenheten. Burkarna transporterades i kylväskor inuti en påse med kylklampar till enheten, så att de skulle hållas frysta under transporten. På undersökningsenheten förflyttades proverna på nytt till en frys där de förvarades i -70°C för framtida analyser.

Sammanlagt samlades tolv burkar med avföringsprov in, av vilka sex samlades in före interventionsperiodens början och sex under interventionsperiodens sista vecka. Avföringsproverna som togs före testperioden betecknades som A-prov, medan de som togs efter testperioden betecknades som B-prov. Ett mikroavföringsprov samlades även in före testperioden och i slutet av den, men detta användes inte för analysen av N-nitroso föreningar.

5.1.2 Framställning av avföringshomogenat

Före analysen av mängden N-nitroso föreningar i proven kunde börja, framställdes 1:5 avföringshomogenat av avföringsproverna som samlats in från testdeltagarna. Homogenat framställdes från det inledande skedets och det avslutande skedets prover. Ett homogenat framställdes så att avföring från två olika dagar av samma undersökningsskede blandades. Homogenat som framställdes av prov som togs före testperioden kunde t.ex. framställas av avföring från dag ett (prov 1A) och dag två (prov 2A). De avföringsprov som skulle användas för framställning av homogenat togs fram till ett kylskåp (+ 5°C) så att de skulle hinna börja smälta under natten. Under framställningen av homogenaten hölls alla prover alltid nedkylda med is.

Vid framställningen av homogenaten vägdes 5 g + 5 g avföring upp ur vardera provburken med två decimalers noggrannhet på en våg (Mettler PJ3600 Deltarange). Avföringen lades i ett homogeniseringsrör tillsammans med 40 ml milli-Q vatten. Provet homogeniserades med en dispergeringsmaskin (IKA T-18 Ultra Turrax) i två minuters tid med hastigheten 13000 - 15000 rpm. Homogenatet fördelades därefter i 2 x 5 ml kryorör (Thermo Scientific) per testperson så att det sammanlagt från alla testpersoner blev fyra kryorör med homogenat, två från det inledande skedet och två från slutskedet. Homogenaten frystes sedan ned och förvarades i -70 °C - -80 °C.

5.1.3 Använda lösningar

För analysen av N-nitroso föreningar framställdes ett antal olika lösningar. Ett hållbarhetsämne framställdes genom att 250 mg N-etylmaleimidea (Sigma Aldrich, USA, M = 125 g/mol) och 78 mg dietylen triamin penta-ättiksyra, DTPA (Sigma-Aldrich, Tyskland, M = 393 g/mol) blandades i 20 ml HPLC vatten (Fisher Chemical, England), hög prestanda vätskekromatografi vatten (*engl. High Performance Liquid Chromatography*), så att koncentrationen blev 0,1 M N-etylmaleimidea och 0,01 M DTPA. För uppvägningen av alla mängder till lösningar användes en våg med fyra decimalers noggrannhet (Precisa XT 22A). Hållbarhetsämnets uppgift är att alkylera nitroso föreningarnas fria tiolgrupper och binda metalljoner, som kan frigöra NO-gruppen från nitrosotiolerna. Lösningen förvarades mörkt i +4 °C i upp till fyra veckors tid.

En trijodidlösning framställdes av 1 g kaliumjodid (Sigma-Aldrich, Chile, $M = 166 \text{ g/mol}$) och 0,65 g jod (Acros Organics, England, $M = 253,81 \text{ g/mol}$) som blandades med 20 ml HPLC vatten och 70 ml ättiksyra (WWR Chemicals, Frankrike). Ny trijodidlösning gjordes alla analysdagar. Trijodidlösningens uppgift är att frigöra NO-gruppen från nitrit, nitrosotiol, nitrosoaminer, järnnitrosylhemoglobin och nitrosohemoglobin. En sur sulfanilamid lösning (SA, *engl. acidic sulphanilamide*) framställdes genom att 1 g sur sulfanilamid (Acros Organics, Kina) blandades med 20 ml 1 M saltsyra (HCl, *engl. hydrochloric acid*, Sigma-Aldrich, Tyskland). Lösningen tillverkades varje analysdag och lagrades inte. SA-lösningen användes för att fastställa den totala mängden nitrit. Lösningen reagerar med nitrit och bildar ett diatsokomplex som är stabilt i trijodidlösningen.

För att fastställa mängden nitrosotiol i proven framställdes en 10 mM kvicksilverklorid (HgCl_2 , Sigma-Aldrich, Indien, $M = 271,5 \text{ g/mol}$) lösning. Den tillverkades genom att 0,27 g HgCl_2 blandades med 100 ml HPLC vatten. Lösningen förvarades i $+4^\circ\text{C}$ i upp till två veckor. En 10 mM trihydrat kaliumferricyanid ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Acros Organics, Spanien, $M = 422,39 \text{ g/mol}$) lösning gjordes för att fastställa mängden nitrosylhem i avföringsproven. Den framställdes genom att 0,42 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ blandades med 100 ml HPLC vatten. Lösningen förvarades i $+4^\circ\text{C}$ i upp till två veckors tid.

1 M natriumhydroxid (NaOH, Riedel-de Haën, Tyskland, $M = 40 \text{ g/mol}$) framställdes för att användas i den högra kammaren av purge vesseln. Lösningen framställdes av 20 g NaOH som blandades med 500 ml HPLC vatten. NaOH lösningen kunde förvaras under en längre tid. För analysen framställdes också dagligen standardlinjens lösningar. Standardlösningarna framställdes av natriumnitrit (NaNO_2 , Sigma-Aldrich, USA, $M = 69 \text{ g/mol}$) och HPLC vatten. Totalt framställdes tio standardlösningar som hade koncentrationerna (pmol/50 μl); 20, 40, 60, 80, 100, 200, 350, 500, 650 och 800.

5.1.4 Förberedelse av avföringsprover för analys

Till analysen av halten av N-nitroso föreningar i proven användes 1:5 avföringshomogenat. Ungefär 1 ml smält avföringshomogenat pipetterades i fyra olika eppare (Eppendorf Safe-Lock Tubes Colorless 1,5 ml). Tre av dem frystes ner på nytt medan en av dem togs till vara för vidare analys. Epparen kördes i en äggfug (Wealtec E-centrifuge) under några sekunders tid för att de större partiklarna skulle sjunka till botten. Efter det här pipetterades 100 μl

avföringsprov till tre mörka eppare (Eppendorf Safe-Lock Tubes Amber 1,5 ml) för att proven skulle skyddas från ljus. Proven märktes som A, B och C, av vilka A-provet användes för analysen av totala mängden N-nitroso föreningar, B-provet för N-tiol föreningar och C-provet för N-hem föreningar.

5.1.5 Analys av N-nitroso föreningar

Avföringsproven analyserades för den totala mängden N-nitroso, N-tiol och N-hem föreningar. Analysen skedde med hjälp av en NO-analysator (Eco Medics Exhalyzer CLD88). Analysatorn stod i kontakt med två kammare via ett filter. Den högra kammaren fylldes före analys till hälften med NaOH. Den vänstra kammaren, en purge vessel, fylldes med 15 ml trijodidlösning till vilken var tillsatt 250 µl antifoam lösning (Sigma-Aldrich, USA). Trijodidlösningen byttes alltid med sex injektioners mellanrum, dvs. med två provers mellanrum.

I nedre delen av kammaren med trijodidlösningen fanns en kork med ett gummifilter. Det var genom detta filter som proverna injicerades med en engångsspruta. Den vänstra kammaren med trijodidlösningen, stod i kontakt med ett vattenbad med + 60 °C (Lauda Alpha A6) vatten. Ett vattenbad med + 4 °C (LKB 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator) vatten var kopplat till den högra kammaren med NaOH lösningen. Vattenbaden och systemen lades på ungefär en timme före analysen av N-nitroso föreningar började.

Före analys öppnades den större och mindre ventilen på en stor gasflaska innehållandes heliumgas. Heliumgasen fungerade som bärgas. Gasflaskans mätare justerades så att den visade 1 bar eller litet över. Nålventilen på gasslangen som gick till purge vesselns vänstra kammaren öppnades också. Ventilen justerades så att mätaren visade ungefär 0 mbar.

Alla dagar före analys av de egentliga proverna kördes standardlinjens prover som var tio till antalet. Standardlinjens prover injicerades med en Hamilton spruta (Hamilton syringe) som fylldes till 50 µl strecket. Efter att alla 10 prover injicerats granskades standardlinjens pika. Om värdena var godtagbara kunde analysen fortsätta, men om värdena var avvikande gjordes standardlinjens lösningar om och de mättes på nytt. Varje dag kördes även ett kontrollprov, som alltid var detsamma, före analysen av de egentliga proverna. Kontrollprovet bestod av flera avföringshomogenat som blandats samman till ett. Om också värdet för kontrollprovet överensstämde med tidigare dagars värden för provet, kunde analysen av de egentliga proverna börja.

Av varje avföringsprov injicerades totalt tre prov; ett för analysen av N-nitroso föreningar, ett för N-tiol föreningar och ett för N-hem föreningar. För analysen av totala mängden N-nitroso föreningar, inkuberades ett prov med 100 µl hållbarhetsämne under 1 minut och därefter med 500 µl SA-lösning under 4 minuter. Med hjälp av det här provet räknades den totala mängden N-nitroso föreningar ut. För analysen av N-tiol föreningar, inkuberades ett prov med 100 µl hållbarhetsämne under 1 minut och därefter med 500 µl SA-lösning under 1 minut. Till sist inkuberades provet med 100 µl HgCl₂ under 3 minuter. Det här provet användes för uträkningen av N-tiolernas mängd. För analysen av N-hem föreningar, inkuberades ett prov med 100 µl hållbarhetsämne under 1 minut och därefter med 500 µl SA-lösning under 1 minut. Den sista inkubationen bestod av 100 µl HgCl₂ och 100 µl K₃Fe(CN)₆ under 3 minuter. Med hjälp av det här provet räknades mängden N-hem föreningar ut.

Efter varje inkubation blandades varje prov noggrant genom att vortexeras (Vortex-gene 2 Scientific Industries). Proven injicerades var för sig genom gummifiltret som stod i kontakt med den vänstra kammaren med trijodidlösningen. Hela den mängd lösning som fanns i epparen med provet injicerades i purge vesseln. Till injiceringen användes 2 ml engångssprutor (BD Discardit II 2 ml och Chirana T. Injecta 2 ml) och 21G och 20G engångsnålar (BD Microlance 3 21G och Terumo Neolus 20G x 1 ½").

Efter uträkning för mängden N-tiol föreningar blev dock de flesta av dessa värden negativa, vilket ledde till att man omarbetade metoderna och analyserade avföringsproverna för tioler en andra gång. För att kunna räkna ut mängden N-tioler i proverna behövdes även proverna för analys av den totala mängden N-nitroso föreningar köras på nytt. Den här gången injicerades provet för analysen av den totala mängden N-nitroso föreningar med 100 µl hållbarhetsämne under 1 minut och därefter med 500 µl SA-lösning under 9 minuter. Provet för analysen av N-tiol föreningar injicerades med 100 µl hållbarhetsämne under 1 minut, 500 µl SA-lösning under 9 minuter och 100 µl HgCl₂ under 3 minuter.

NO-analysatorn mäter den NO-gas som frigörs från kväveföreningarna i avföringsproven. NO-gasen frigörs från föreningarna i den vänstra kammaren med hjälp av de lösningar som kan reducera kväveföreningar. Analysatorns dataprogram (PowerChrom, eDAQ) ritade pikar av halten NO-föreningar. Genom att räkna ut pikarnas area kan man sluta sig till mängden av de olika typerna föreningar i avföringsproverna, sedan jämförs den här mängden mot de tidigare kända mängderna i standarderna. NO-analysatorn ritade tre pikar för varje deltagares

avföringsprov. A-piken visade på mängden totala N-nitroso föreningar, B-piken, som användes för uträkningen av N-tiol föreningar, mängden kvicksilver känsliga föreningar och C-piken, som användes för uträkningen av mängden N-hem föreningar, mängden kvicksilver och kaliumferricyanid känsliga föreningar.

5.2 Statistiska metoder

Före de statistiska analyserna räknades mängden totala N-nitroso föreningar, N-tiol föreningar och N-hem föreningar ut i avföringsproverna utgående från de värden som NO-analysatorn mätt. Mängden N-nitroso föreningar räknades ut genom att dela det av NO-analysatorn uppmätta värdet för totala mängden N-nitroso föreningar (A-piken) med 20, så att mängden i pmol/mg avföring fås. N-tiolernas mängd i pmol/mg räknades ut genom att från den totala mängden N-nitroso föreningar (A-piken), minska med värdet för de kvicksilverkänsliga föreningarna (B-piken) och sedan dela detta resultat med 20. Mängden N-hem föreningar räknades ut genom att från den totala N-nitroso föreningarna (A-piken), minska med värdet för de kvicksilver och kaliumferricyanid känsliga föreningarna (C-piken) och därefter dela detta värde med 20. Före analysen granskades även materialet för eventuella fel eller avvikande värden. Proven från nummer 18 var de enda som lämnades bort från alla analyser efter granskningen, det här eftersom inga prover erhöles i slutet av interventionen. Också ett N-hem värde från det inledande skedet lämnades bort vid analysen, eftersom det var negativt.

För de statistiska analyserna användes statistikprogrammet IBM SPSS Statistics 25. Medeltal, standardavvikelse och median räknades ut för de olika typerna av föreningar i de tre grupperna. Värdenas normalfördelning testades med Shapiro-Wilk test samt genom att granska diagram. Som gräns för värdenas normalfördelning användes värdet $<0,05$. Värdena var inte normalfördelade från början, därför logaritmerades de. Efter det här granskades normalfördelningen på nytt med Shapiro-Wilk test och genom att granska diagrammen. Testet visade att alla värden var normalfördelade efter logaritmering.

Interventionsgruppen var vid analys den oberoende variabeln, mängden av de olika föreningarna var den beroende variabeln. One-way ANOVA test utfördes för att undersöka om det fanns signifikanta skillnader i värdena mellan grupperna i undersökningens utgångsskede (vecka 0) och i undersökningens slutskede (vecka 12). För att undersöka mellan vilka grupper dessa eventuella skillnader fanns utfördes ett ANCOVA och Post Hoc test med

multipla jämförelser, i det här fallet ett Bonferroni test. En kovariansanalys utfördes även med utgångspunkten som kovariat, så att gruppernas utgångsläge tas hänsyn till då man jämför eventuella skillnader mellan grupperna. Samma test utfördes också för den totala mängden föreningar sett till avföringens totalvikt. Avföringens totalvikt syftar i detta fall till summan av de båda provernas (som användes till framställning av homogenaten) totala avföringsvikt under de dagar som proverna hade samlats in på. Den totala avföringens vikt räknades ut med hjälp av vikterna som uppgivits av deltagarna för de dagar då avföringsproven samlats in. För att räkna ut den totala mängden föreningar i avföringsproven, multiplicerades de ursprungliga värdena med 1000 för att omvandla värdena från pmol till nmol, sedan multiplicerades detta värde med avföringstillfällenas vikt i gram. Korrelation undersöktes med Pearson test mellan N-nitroso föreningar och fiber, protein och avföringsvikt. Som gräns för statistisk signifikans användes värdet $<0,05$ för alla analyser. För att åskådliggöra resultaten visuellt användes boxplot diagram och korrelationsdiagram.

5.3 Etiska frågor och dataskydd

ScenoProt har för undersökningen av kostens proteinsammansättning och dess påverkan på riskfaktorerna för tjocktarmscancer och typ 2 diabetes hos friska vuxna, fått ett etiskt utlåtande och godkännande 11.10.2016. Utlåtandet fick man från den koordinerade etiska kommittén vid Helsingfors och Nylands sjukvårdsdistrikt. Kommittén ansåg att undersökningsplanen och dess bilagahandlingar följer de regler, dataskyddsregler och de nationella skyldigheter som hör ihop med medicinska undersökningar och undersökningspatienter som medicinska undersökningar på människor förutsätter.

I undersökningen har alla deltagares uppgifter och personliga information behandlats konfidentiellt. Ingen information om deltagarna har lämnats vidare till utomstående personer utanför undersökningen. Alla deltagare har även tilldelats ett undersökningsnummer och deltagarnas information har analyserats med dessa nummer, som identifikation för vilken deltagare materialet gäller.

6. RESULTAT

6.1 Bakgrundsinformation

Mängden personer som svarade på annonserna och reklamen gällande rekryteringen av deltagare till undersökningen var 543 personer. Av dessa slutförde 179 informerat samtycke och den kliniska screeningen. Mängden personer som gick med i undersökningen var till slut 146 personer. En av dessa personer avbröt undersökningen före dess början på grund av personliga orsaker. Grupp 1 bestod i undersökningens början av 48 personer, grupp 2 av 48 personer och grupp 3 av 49 personer. Av dessa personer avbröt en del undersökningen under interventionsperiodens gång. Fyra personer avbröt på grund av bristande förmåga att följa testdieten, en person avbröt på grund av att denne inte uppfyllde inkluderingskriterierna, två avbröt till följd av orelaterad sjukdom och en på grund av orelaterad medicinering. Den slutliga mängden deltagare vars resultat inkluderas i dataanalysen var därmed 46 personer i grupp 1, 46 personer i grupp 2 och 44 personer i grupp 3.

Vid uträkningarna gällande analyserna av mängden N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar lämnades ytterligare en person från grupp 2 bort, eftersom denne endast lämnat in avföringsprover före undersökningens början. Gällande N-tiol föreningarna lämnades de deltagare bort som hade värden som lämnade under detektionsgränsen, gällande N-tioler är därför $n=37$ för grupp 1, $n=30$ för grupp 2 och $n=31$ för grupp 3. Gällande avföringsvikten hade två personer inte rapporterat den i det inledande skedet, vilket ledde till att proverna från det inledande skedet av dessa två, inte kunde analyseras för den totala mängden N-nitroso föreningar i avföringsproven. Matdagböcker från två personer fattades och därför lämnades dessa bort vid analys.

Deltagarna hade BMI som låg mellan 20,5 – 35 kg/m². Könsfördelningen i undersökningen var 107 kvinnor och 29 män. Medelåldern bland deltagarna var 48 år och alla deltagare var inom åldern 20 – 69 år. Av deltagarna jobbade 60 %, 19 % var pensionärer och 57 % var studerande i kandidatskedet eller magisterskedet.

6.2 N-nitroso föreningar

Före interventionsperiodens början kan man i tabell 1 se att mängden totala N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar (pmol/mg avföring) i grupperna ligger nära varandra. Före interventionsperiodens början fanns det inga statistiskt betydelsefulla

skillnader i mängden N-nitroso föreningar och N-hem föreningar i avföringen (pmol/mg) mellan grupperna, vilket man kan se i tabell 3. Däremot visade One Way ANOVA testet att skillnader under vecka 0 fanns i mängden N-tioler mellan grupperna, men vid jämförelse mellan de enskilda grupperna är skillnaden ändå inte betydelsefull för någon av grupperna. I tabell 2 åskådliggörs den totala mängden föreningar (nmol/totalvikt avföring) i de två avföringstillfällena, som avföringsprov togs från och som användes till framställningen av homogenaten.

Under interventionsperiodens sista vecka (vecka 12) kan man däremot se att det finns skillnader mellan grupperna gällande mängden föreningar i pmol/mg avföring. I tabell 3 kan man se att skillnaderna är betydelsefulla gällande N-nitroso föreningar mellan grupp 1 (70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner) och grupp 3 (30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner). Gällande N-hem föreningar finns en betydelsefull skillnad mellan grupp 1 och grupp 3 och också gällande N-tiol föreningar finns en betydelsefull skillnad mellan grupp 1 och grupp 3. Även gällande den totala mängden föreningar (nmol/totalvikt) i de två avföringsproverna som användes för framställning av homogenaten, kan en nedåtgående trend ses i mängden föreningar under interventionsperioden sista vecka i tabell 2.

TABELL 1. Mängden totala N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar (pmol/mg) i avföringen hos testgrupperna före interventionsperioden (vecka 0) och under interventionsperiodens sista vecka (vecka 12).

Grupp	N	Totala N-nitroso		N-Hem		N ¹	N-tiol	
		Vecka 0	Vecka 12	Vecka 0	Vecka 12		Vecka 0	Vecka 12
Djur 70: plant 30	46	4,3 ± 3,9	4,0 ± 2,4	2,8 ± 3,3	2,5 ± 1,9	37	0,46 ± 0,43	0,37 ± 0,41
Djur 50: plant 50	45	4,2 ± 3,3	3,2 ± 1,8	2,5 ± 2,5	1,8 ± 1,4	30	0,33 ± 0,41	0,25 ± 0,37
Djur 30: plant 70	44	4,5 ± 3,0	2,7 ± 1,5	2,9 ± 2,4	1,4 ± 0,9	31	0,69 ± 1,03	0,20 ± 0,29

¹Värden som lämnade under gränsen för detektion, inkluderades inte i analysen, därför är N mindre för N-tiol analysen än för övriga analyser.

TABELL 2. Mängden totala N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar (nmol/totalvikt) i avföringen hos testgrupperna före interventionsperioden (vecka 0) och under interventionsperiodens sista vecka (vecka 12).

Grupp	N	N-nitroso		N-hem		N ¹	N-tiol	
		Vecka 0	Vecka 12	Vecka 0	Vecka 12		Vecka 0	Vecka 12
Djur 70: plant 30	46	1435 ± 962	1525 ± 992	917 ± 822	951 ± 749	37	152 ± 142	145 ± 176
Djur 50: plant 50	44	1499 ± 1261	1497 ± 895	916 ± 962	827 ± 588	29	141 ± 214	112 ± 155
Djur 30: plant 70	43	1595 ± 977	1219 ± 550	1000 ± 836	595 ± 374	31	249 ± 404	79 ± 86

¹Värden som lämnade under gränsen för detektion, inkluderades inte i analysen, därför är N mindre för N-tiol analysen än för övriga analyser.

TABELL 3. Jämförelse av halten av N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar mellan grupperna vid vecka 0 och vecka 12 och testning för statistisk signifikans. Grupp 1: 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, grupp 2: 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och grupp 3: 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner.

Förening	Tidpunkt	One Way ANOVA ¹	Interventionsgrupper		P-värde ²
N-nitroso	Vecka 0	0,478	1	2	1,000
			1	3	0,876
			2	3	0,874
N-hem	Vecka 0	0,462	1	2	1,000
			1	3	0,798
			2	3	0,898
N-tiol	Vecka 0	0,044	1	2	0,083
			1	3	1,000
			2	3	0,088
N-nitroso	Vecka 12	0,006	1	2	0,199
			1	3	0,004
			2	3	0,472
N-hem	Vecka 12	0,001	1	2	0,136
			1	3	0,000
			2	3	0,198
N-tiol	Vecka 12	0,037	1	2	0,313
			1	3	0,036
			2	3	1,000

¹Jämförelse mellan grupperna under vecka 0 och vecka 12, signifikant om <0,05.

²Post hoc Bonferroni test med multipla jämförelser mellan grupperna, signifikant om <0,05.

I tabell 4 har gruppernas utgångsläge gällande mängden N-nitroso, N-hem och N-tiol föreningar tagits i beaktande så att utgångsläget fungerat som kovariat i en kovariansanalys. Det finns en betydelsefull skillnad i mängden N-nitroso föreningar (pmol/mg) mellan grupp 1 och grupp 3 under interventionsperiodens sista vecka (vecka 12). Gällande N-hem föreningar (pmol/mg) är skillnaden betydelsefull mellan grupp 1 och grupp 3 men även mellan grupp 2 (50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner) och grupp 3. Mellan grupp 1 och 2 är skillnaden också nära att vara betydelsefull gällande N-hem föreningar. En betydelsefull skillnad finns även mellan grupp 1 och grupp 3 gällande N-tiol föreningar (pmol/mg).

Man kan se en dosberoende minskning av mängden föreningar mellan grupperna under interventionsperiodens sista vecka (vecka 12). Denna minskning kan ses för alla tre typer av föreningar. I bild 2 åskådliggörs totala mängden N-nitroso föreningar, i bild 3 N-hem föreningar och i bild 4 N-tiol föreningar både före interventionsperiodens början och under dess sista vecka. Sett till den totala vikten för avföringen (nmol/totalvikt) finns en betydelsefull skillnad mellan grupp 1 och grupp 3 gällande N-hem föreningar, se bild 5.

TABELL 4. Jämförelse mellan grupperna gällande N-nitroso, N-hem och N-tiol föreningar under slutskedet, med hänsyn till gruppernas utgångsläge. Grupp 1: 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, grupp 2: 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och grupp 3: 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner.

Förening	Vecka	ANCOVA ¹	Interventionsgrupper		P-värde ²	
					pmol/mg ³	nmol/totalvikt ⁴
N-nitroso	12	0,000	1	2	0,116	1,000
			1	3	0,000	0,110
			2	3	0,096	0,215
N-hem	12	0,000	1	2	0,074	0,913
			1	3	0,000	0,007
			2	3	0,035	0,128
N-tiol	12	0,034	1	2	0,761	1,000
			1	3	0,030	0,091
			2	3	0,560	0,679

¹Jämförelse mellan grupperna under vecka 12 (pmol/mg), signifikant om <0,05.

²Kovariansanalys med utgångsläget som kovariat, signifikant om <0,05.

³Värdena som man fick från analysen av N-nitroso föreningar, anges i pmol/mg.

⁴Har räknats ut i efterhand baserat på värdena i pmol/mg och avföringens totalvikt, anger den totala mängden föreningar i nmol/totalvikt avföring.

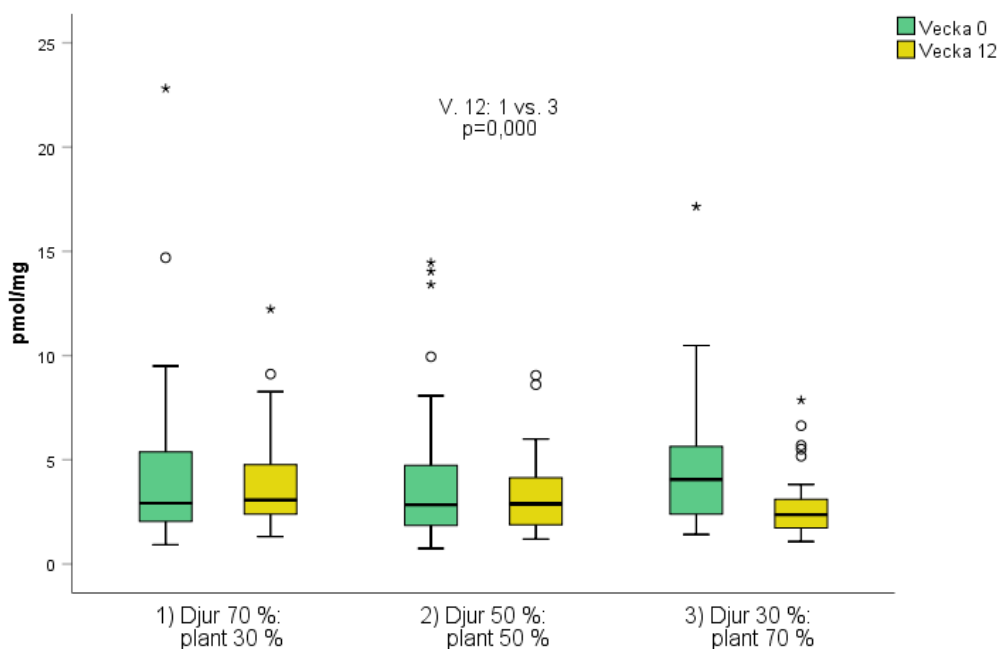


BILD 2. Mängden totala N-nitroso föreningar i pmol/mg avföring före interventionsperioden (vecka 0) och under interventionsperiodens sista vecka (vecka 12). Boxarna innehåller hälften av observationerna och tvärstrecket visar medianens plats. Streckens avslut motsvarar det största och minsta observerade värdet; avvikande värden betecknas med cirklar och stjärnor.

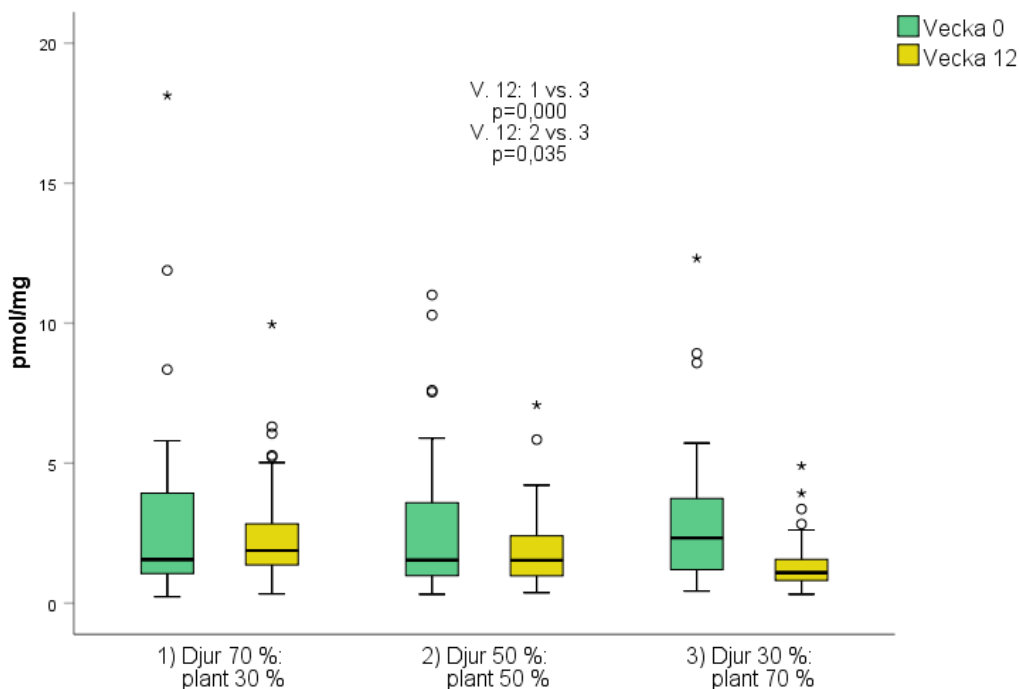


BILD 3. Mängden N-hem föreningar i pmol/mg avföring före interventionsperioden (vecka 0) och under interventionsperiodens sista vecka (vecka 12). Boxarna innehåller hälften av observationerna och tvärstrecket visar medianens plats. Streckens avslut motsvarar det största och minsta observerade värdet; avvikande värden betecknas med cirklar och stjärnor.

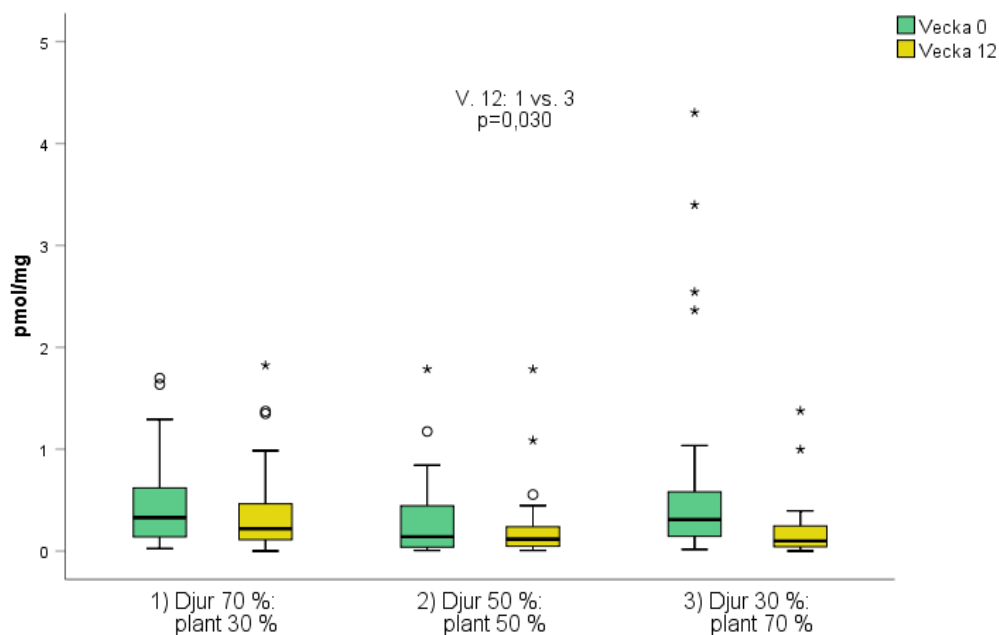


BILD 4. Mängden N-tiol föreningar i pmol/mg avföring före interventionsperioden (vecka 0) och under interventionsperiodens sista vecka (vecka 12). Boxarna innehåller hälften av observationerna och tvärstrecket visar medianens plats. Streckens avslut motsvarar det största och minsta observerade värdet; avvikande värden betecknas med cirkclar och stjärnor.

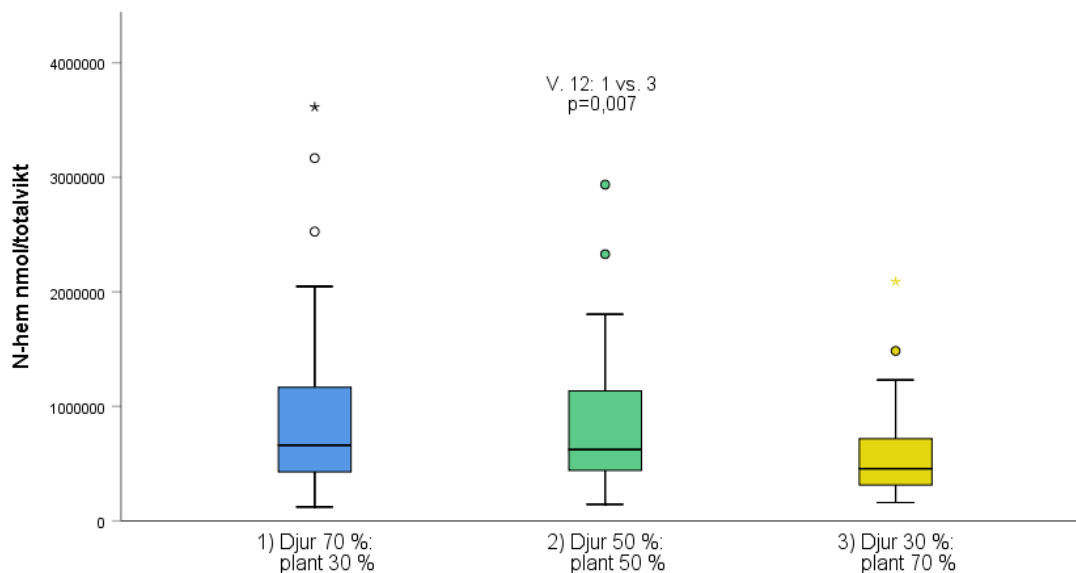


BILD 5. Mängden N-hem föreningar i nmol/avföringens totalvikt i de tre grupperna under interventionsperiodens sista vecka. Boxarna innehåller hälften av observationerna och tvärstrecket visar medianens plats. Streckens avslut motsvarar det största och minsta observerade värdet; avvikande värden betecknas med cirkclar och stjärnor.

I slutet av interventionsperioden finns det även en betydelsefull skillnad mellan grupp 1 (70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner) och grupp 2 (50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner), i avföringsvikts medeltal, se bild 6. Gällande medeltal hade grupp 1 den minsta avföringsvikten medan grupp 2 hade den största vikten. I bilaga 2 finns information om avföringsvikten för de tre grupperna före och i slutet av interventionsperioden. Avföringsvikten korrelerade även med både fiberintaget ($p=0,000$) och den totala mängden N-nitroso föreningar ($p=0,000$) i avföringen, vilket också åskådliggörs i bilaga 3. Med ökande fiberintag ökade också avföringsvikten. Då mängden N-nitroso föreningar i avföringen ökade (pmol/mg), minskade däremot avföringsvikten.

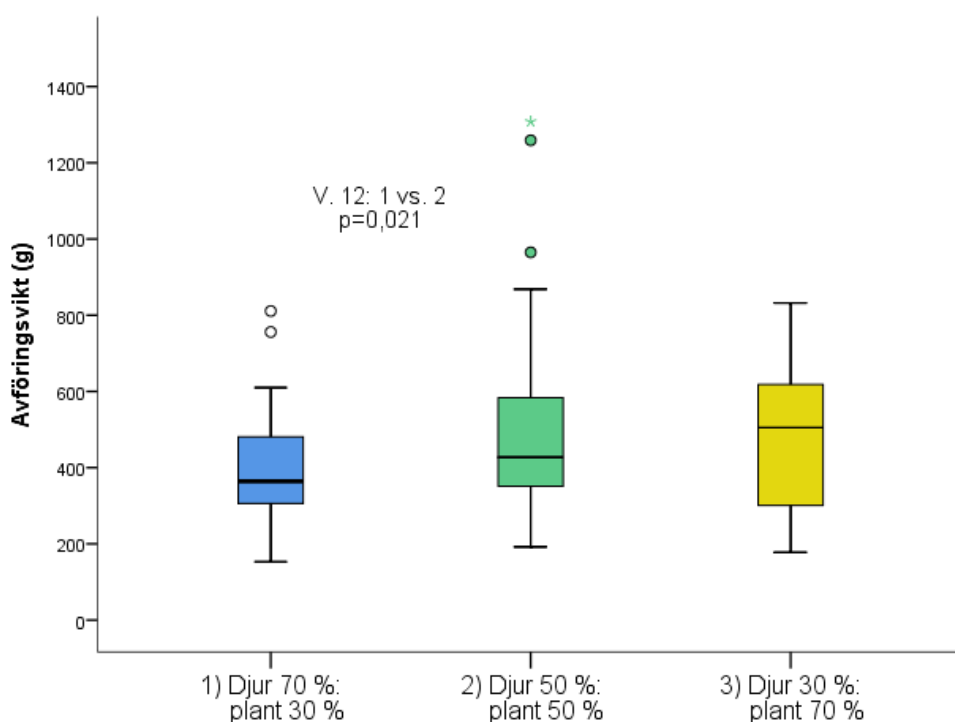


BILD 6. Den sammanlagda vikten i gram för de två av slutskedets avföringstillfällen varifrån avföringsproverna togs. Boxarna innehåller hälften av observationerna och tvärstrecket visar medianens plats. Streckens avslut motsvarar det största och minsta observerade värdet; avvikande värden betecknas med cirklar och stjärnor.

Proteinintaget korrelerade inte med mängden N-nitroso föreningar i avföringen ($p=0,622$), se bild 7. Fiberintaget korrelerade däremot med mängden N-nitroso föreningar ($p=0,036$), vilket kan ses i bild 8. Det totala fiberintaget korrelerade med mängden N-nitroso föreningar och N-hem föreningar men inte med mängden N-tiol föreningar i avföringen. Se bilaga 3 för mera information om korrelationer gällande fiber och proteiner med olika typer av N-nitroso föreningar. Intaget av de olika näringsämnen, däribland protein och fiber, behandlas i en annan magistersavhandling inom undersökningen ScenoProt, därför behandlas det inte närmare här.

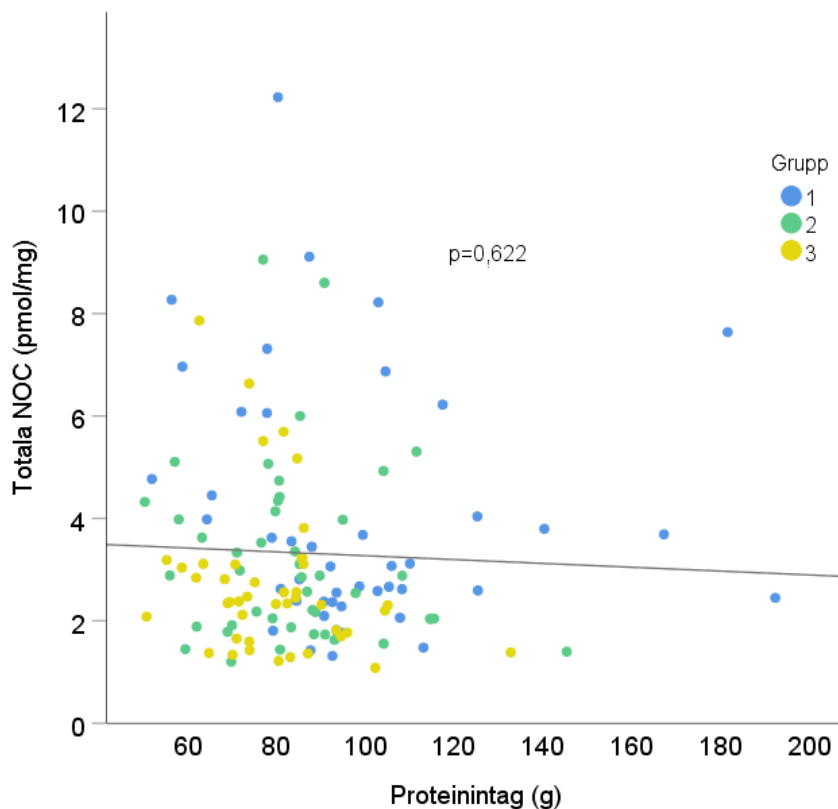


BILD 7. Ingen korrelation mellan proteinintag och totala mängden NOC i avföringen under vecka 12 kunde ses. Grupp 1: 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, grupp 2: 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och grupp 3: 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner. Pearson korrelation där gränsen för statistisk signifikans är $<0,05$.

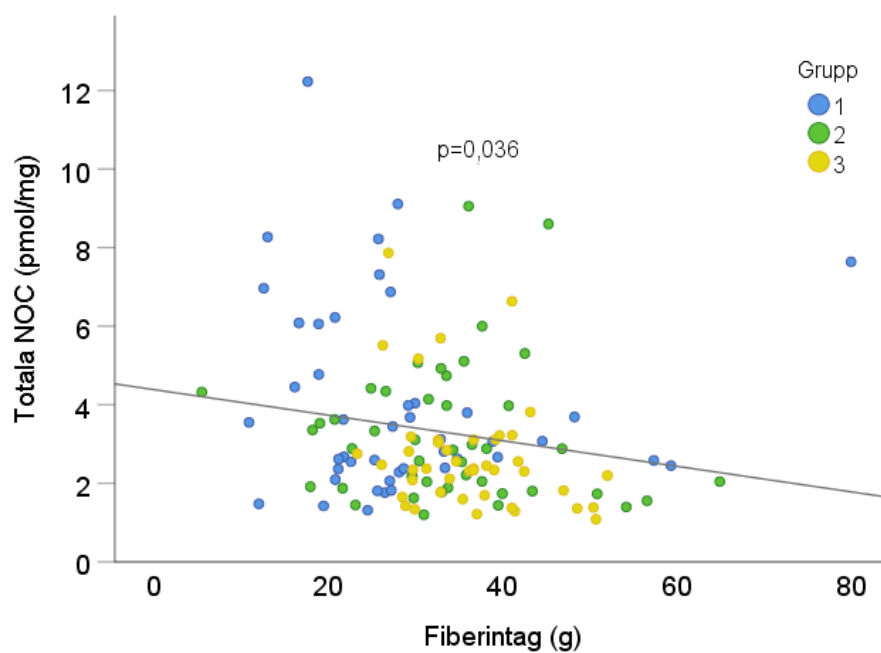


BILD 8. Korrelation mellan fiberintag och totala mängden NOC i avföringen kunde ses under vecka 12. Grupp 1: 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, grupp 2: 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och grupp 3: 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner. Pearson korrelation där gränsen för statistisk signifikans är $<0,05$.

7. DISKUSSION

7.1 Granskning av undersökningsresultaten

Grupp 1 och grupp 3 är de två grupperna i undersökningen med de största skillnaderna i kosten gällande proteinkällorna. I grupp 1 bestod proteinintaget av 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner och i grupp 3 var förhållandet det motsatta, 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner. Grupp 3 var den grupp där den största andelen av djurproteiner ersatts med plantproteiner. Det är därför logiskt att skillnaden mellan grupp 1 och grupp 3 gällande mängden N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar är störst, vilket bekräftades av resultaten som visade att skillnaderna var statistiskt betydelsefulla gällande mängden av alla föreningar (pmol/mg) mellan grupp 1 och grupp 3. Tabell 3 är den som ger den mest riktiga bedömningen av skillnaderna mellan grupperna eftersom den också tar hänsyn till gruppernas utgångsläge gällande halten av föreningarna. Det är av stor betydelse att utgångsläget i mängden föreningar inte skiljde sig åt mellan grupperna, eftersom det här gör slutskedets resultat mera tillförlitliga.

Hypotesen för den här undersökningen var att halten av N-nitroso föreningar i avföringen kommer att vara mindre hos de som ätit en kost där en del av djurproteinkällorna ersatts med plantproteinkällor, jämfört med de som fått en större mängd av sina proteiner från djurproteinkällor. Speciellt rött kött och processat kött innehåller stora mängder hemjärn, nitriter, aminer, amider och nitroso agenter som alla anses kunna bidra till en ökad bildning av N-nitroso föreningar (Tricker m.fl. 1991). Också vitt kött innehåller aminer och amider, men hemjärn i mindre mängder (Bingham m.fl. 2002). Hemjärn kan fungera som en katalysator för bildningen av N-nitroso föreningar (Bastide m.fl. 2011). Aminer och amider kan i sin tur bilda N-nitroso föreningar genom att reagera med nitroso agenter (Tricker m.fl. 1991). Nitroso agenter kan ha sitt ursprung i nitriter som det speciellt finns mycket av i processade köttprodukter (Dunrow m.fl. 2010). Det var den här informationen som hypotesen grundade sig på.

Resultaten från undersökningen är i linje med den ursprungliga hypotesen, eftersom en stegvis minskning i halten av alla tre föreningar kan ses då man ersätter djurproteiner med plantproteiner. En betydelsefull skillnad i mängden föreningar ses främst mellan grupp 1 och grupp 3. Det ser alltså ut som att en betydande minskning av mängden djurproteiner behövs

för att man skall få en betydelsefull minskning i mängden N-nitroso föreningar i avföringen. Men gällande N-hem föreningar var skillnaden mellan grupp 1 och 2 nära statistisk signifikans ($p=0,074$). Även om detta inte var en betydelsefull skillnad, behöver inte detta betyda att denna skillnad inte är biologiskt betydelsefull. I och med den betydelsefulla skillnaden gällande N-hem föreningar mellan grupp 2 och grupp 3, tyder resultaten också på att de som redan har en kost som innehåller en del plantproteiner, kan ha ytterligare nytta av att ersätta ännu mera djurproteiner med plantproteiner baserat på mängden N-nitroso föreningar i avföringen.

Eftersom källorna till protein kontrollerades noggrant i den här undersökningen, kan man sluta sig till att mycket av förändringarna som kan ses i halterna av N-nitroso föreningarna i avföringen, beror just på skillnaderna i proteinkällorna. Deltagarna uppmanades att hålla intaget av fett likadant som före interventionsperiodens början och sådana livsmedel som inte är proteinkällor fick de konsumera som de ville. Källorna till protein var den stora förändringen i deltagarnas kost, vilket innebär att de också borde vara den främsta orsaken till de observerade förändringarna i mängden N-nitroso, N-hem och N-tiol föreningar. Intaget av protein kunde inte heller ses korrelera med mängden totala N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar. Vilket också indikerar på att mängden protein man konsumerar inte direkt har någon inverkan på bildningen av N-nitroso föreningar, utan att det är typen av proteinkälla som främst kommer att påverka bildningen.

Halterna av N-tiol föreningar i vår undersökning var så låga att de med de ursprungliga metoderna och förhållandena inte kunde detekteras i proverna, varför nya mätningar med justerade metoder utfördes. I en annan undersökning observerade man också mycket lägre halter av nitrosotiol jämfört med nitrosylhem, vilket antogs bero främst på att rött kött innehåller mycket hemjärn som kan främja bildningen av nitrosylhem. Även om halterna i den undersökningen av tiolbaserade föreningar ändå var så höga att de kunde detekteras (Kuhnle m.fl. 2007).

I vår undersökning granskades förutom koncentrationen (pmol/mg) av de olika typerna av N-nitroso föreningar i avföringen, också den totala mängden föreningar (nmol/totalvikt) i de två dagarnas avföringstillfällena som avföringsproverna togs ifrån. Koncentrationen av N-nitroso föreningar kan berätta om hur utsatt tarmens yta är för föreningarna. En hög koncentration leder t.ex. till att en större andel av de skadliga N-nitroso föreningarna står i kontakt med

tarmens yta, och därmed påverkas tarmens yta mera negativt än om koncentrationen skulle vara lägre. Den totala mängden N-nitroso föreningar i avföringsproven säger däremot något om hur stor kapacitet cellerna eller bakterierna i tarmen har att producera N-nitroso föreningar. Olika tarmmiljöer med olika sammansättning tarmbakterier kan ha olika stor kapacitet att producera N-nitroso föreningar (Hughes m.fl. 2001).

7.2 Jämförelse med tidigare undersökningar

Resultaten i vår undersökning är i samma linje med resultaten från tidigare undersökningar som gjorts gällande N-nitroso föreningar och deras samband med kosten. Även om de här undersökningarna har varit av litet olika typer, utförts på litet olika sätt, har de ändå i grunden haft samma mål; att undersöka N-nitroso föreningarnas samband med kosten. Man har i flera andra undersökningar kunnat se att både en kost med litet rött kött och en vegetarisk kost, leder till mindre mängder N-nitroso föreningar i avföringen, jämfört med en kost med mycket rött kött (Bingham m.fl. 1996, Cross m.fl. 2003, Hughes m.fl. 2001, Joosen m.fl. 2009, Kuhnle m.fl. 2007).

Det som skiljer vår undersökning från många av de andra undersökningarna, är att fokus i vår undersökning låg på ersättning av djurproteinkällor med plantproteinkällor. De flesta andra undersökningar har ofta fokuserat specifikt på mängden rött kött då man studerat N-nitroso föreningarnas samband med kosten. Vår undersökning hade också ett mycket högre deltagarantal och en mycket längre interventionsperiod än någon av de andra undersökningarna.

I en experimentell undersökning med åtta frivilliga manliga deltagare, såg man att halten av N-nitroso föreningar i avföringen var högre hos de som åt en kost med mycket rött kött (600 g/dag) jämfört med de som åt en kost med litet rött kött (60 g/dag) under nio veckors tid (Bingham m.fl. 1996). Det här innebär att deltagarna i gruppen med litet kött konsumerade 420 g rött kött per vecka, vilket motsvarar rekommendationen om rött kött (under 500 g/vecka) i de finländska näringsrekommendationerna (VRN 2014). Mängden motsvarar även målmängden rött och processat kött som deltagarna under en vecka konsumerade i gruppen med 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner i vår undersökning. I Bingham's undersökning orsakade varken fisk eller vitt kött samma ökning av N-nitroso föreningar i avföringen som rött kött gjorde. I den här undersökningen såg deltagarnas dieter lika ut förutom i fråga om

mängden kött, men deltagarmängden var betydligt lägre än i vår undersökning (Bingham m.fl. 1996).

Mängden rött kött i tidigare nämnda experimentella undersökning, var väldigt hög i gruppen med det högre intaget av rött kött (Bingham m.fl. 1996). Enligt Finelis databas med livsmedel består t.ex. en medelstor portion nöt inre filé av 190 g kött, det här innebär att en person skulle behöva äta tre sådana portioner för att komma upp till ett dagligt intag av 600 g rött kött per dag (Fineli 2018). Enligt FinRavinto rapporten från år 2017 äter männen i Finland i medeltal rött kött 490 g/vecka (exklusive mera ovanliga former av rött kött såsom lamm, vilt och organdelar) och korv och charkuterivaror 413 g/vecka, medan motsvarande konsumtion för kvinnor för rött kött är 259 g/vecka och för korv och charkuterivaror 203 g/vecka (FinRavinto 2017). Männens dagliga intag av rött och processat kött är därmed i medeltal 129 g/dygn medan kvinnornas är 66 g/dygn. Det här är betydligt mindre mängder rött och processat kött än vad som använts i tidigare undersökningar. Vår undersökning är därför mera realistisk, eftersom man där inkorporerade proteinkällor som är centrala i den finländska kosten, och inte endast fokuserade på rött kött. Konsumtionen av vitt kött, speciellt kycklingkött, har t.ex. ökat under de senaste åren vilket visar på betydelsen att inte endast fokusera på rött kött (Naturresursinstitutet 2018).

En annan experimentell undersökning som studerade 21 friska män på en kost med litet rött kött (60 g/dag) och mycket rött kött (420 g/dag), visade också på liknande resultat (Cross m.fl. 2003). Undersökningen utfördes på ett randomiserat sätt med överkorsningsdesign i en metabolisk svit under tre perioder på 15 dagar och deltagarna fick all mat från undersökningen. Halten av N-nitroso föreningar i avföringen var högre i gruppen som åt mera rött kött. Om man däremot ersatte proteinerna från kött med samma mängd plantproteiner, observerades inte någon ökning i mängden N-nitroso föreningar. Mängden protein skiljde sig åt mellan de olika diettyperna, dieten med litet rött kött innehöll 65 g protein och dieten med mycket rött kött eller motsvarande mängd plantproteiner innehöll 143–150 g protein. I den här undersökningen observerade man också att tillskott med hemjärn ökade mängden N-nitroso föreningar i avföringen. Resultaten från den här undersökningen är liknande som de i vår undersökning, plantproteiner ser t.ex. inte ut att öka bildningen av N-nitroso föreningar på samma sätt som djurproteiner eller främst rött kött gör. Man menade i undersökningen att innehållet av hemjärn i djurproteinkällor är den troliga förklaringen till detta (Cross m.fl. 2003).

Utgående från resultaten i vår undersökning kan man se att det ser ut att finnas en dosberoende minskning av N-nitroso föreningar i avföringen då man ersätter djurproteiner med plantproteiner i kosten. En dos-beroende ökning av N-nitroso föreningar har i andra undersökningar kunnat ses då intaget av rött kött ökat. I en randomiserad experimentell studie undersökte man effekten av antingen 0 g, 60 g, 240 g eller 420 g rött kött dagligen på mängden N-nitroso föreningar. Studien utfördes under fyra perioder på 10 dagar var, med åtta frivilliga män. Man kunde se att det skedde en stegvis ökning av mängden N-nitroso föreningar i avföringen då intaget av kött ökade. Ingen skillnad sågs dock mellan de två minsta mängderna, 0 g och 60 g kött. Varje testperson fungerade som sin egen kontroll och studien utfördes med en överkorsningsdesign (Hughes m.fl. 2001).

I en annan experimentell undersökning med överkorsningsdesign studerade man 12 friska individer som under undersökningens gång levde i en metabolisk svit. Deltagarna tilldelades slumpmässigt antingen en diet med mycket rött kött (420 g/dag) eller en vegetarisk diet som de följde under tre dagars tid. Mängden nitrosyljärn och nitrosotioler var i gruppen med rött kött betydligt högre än i den vegetariska gruppen. Den vegetariska dieten hade dock ett högre innehåll av fiber, 30 g/dag jämfört med 13 g/dag i dieten med mycket rött kött. Frånsett de här faktorerna var dieterna såg gott som identiska (Kuhnle m.fl. 2007). Också i vår undersökning kunde en stegvis ökning ses i intaget av fiber från gruppen med störst andel djurproteiner ($28,4 \pm 13,2$ g/dag) mot gruppen med störst andel plantproteiner ($36,2 \pm 7,1$ g/dag). Intaget av fiber i den grupp i vår undersökning som åt mest djurproteiner, var ändå betydligt högre än i gruppen i tidigare nämnda undersökning med störst konsumtion av rött kött.

De halter av nitrosyljärn som observerades i Kuhnles undersökningen var betydligt högre än de halter av N-hem föreningar som observerades i vår undersökning. Medelinnehållet av nitrosyljärn i avföringen var 91.6 ± 46.2 pmol/mg för köttgruppen (420 g/dag) och 0.2 ± 0.03 pmol/mg för den vegetariska gruppen (Kuhnle m.fl. 2007). Samma mönster observerades också gällande mängden nitrosotioler. I vår undersökning är motsvarande värden för N-hem föreningar $2,5 \pm 1,9$ pmol/mg för gruppen som hade det högsta intaget av djurproteiner och $1,4 \pm 0,9$ pmol/mg för gruppen som hade det minsta intaget av djurprotein.

En orsak till skillnaden i mängden nitrosyljärn och N-hem föreningar mellan Kuhnles och vår undersökning, är att nitrosyljärn består av olika typer av föreningar, däribland N-hem (Kuhnle

m.fl. 2007). Det här innebär att mängden nitrosyljárn består av den sammanlagda mängden av olika typer av nitrosyljárn föreningar. Men Kuhnle konstaterar ändå att nitrosylhem, eller N-hem föreningar, utgör majoriteten av den uppmätta mängden nitrosyljárn, vilket fortfarande antagligen innebär en mycket högre nivå av N-hem föreningar än den som uppmättes i vår undersökning.

En annan möjlig förklaring till skillnaden i nitrosyljárn kan vara att den grupp i vår undersökning som konsumerade den största andelen djurproteiner, inte specifikt fick sina djurproteiner från rött kött. De fick sina djurproteiner från en blandning av olika källor (se bild 1). Intaget av rött kött i gruppen med det hösta intaget av rött och processat kött är därför mindre i vår undersökning. Det beräknade intaget av rött och processat kött var sammanlagt ungefär 100 g/dag för gruppen med det största intaget av rött och processat kött i vår undersökning. Rött kött har som tidigare konstaterats setts vara den främsta källan till bildningen av N-nitroso föreningar i avföringen, mycket på grund av dess höga innehåll av hemjárn. Ingen av undersökningsgrupperna i vår undersökning åt heller en helt vegetarisk diet. Gruppen som hade den minsta andelen djurproteiner i sin kost (32 g rött och processat kött/dag), hade fortfarande en del icke-vegetariska livsmedel i sin kost, även om de åt betydligt mindre kött, både rött och vitt, än de övriga grupperna. Det här kan förklara varför mängden N-hem föreningar var större i vår grupp med den minsta andelen djurproteiner än i den vegetariska gruppen i Kuhnles undersökning (Kuhnle m.fl. 2007).

I en annan undersökning där man studerade N-nitroso föreningar hade man två grupper med människor som var indelade i två undergrupper (Joosen m.fl. 2009). Undersökningen var randomiserad med en överkorsningsdesign och testdietens längd var 10 dagar, vilket återigen är en mycket kortare längd än vår undersökning hade. Deltagarna fick all mat från undersökningen och levde på undersökningsenheten medan undersökningen pågick. I den ena gruppen med 12 deltagare undersökte man en diet med rött kött jämfört med en vegetarisk diet. I den andra gruppen med 16 deltagare, undersökte man en diet med processat kött (konserverat med nitrit) jämfört med en vegetarisk diet. Dieten med kött innehöll för männen 420 g kött/dag och för kvinnor 366 g kött/dag. Proteinintaget mellan grupperna skiljde sig åt. Grupperna med rött och processat kött hade ett proteinintag på ungefär 145 g/dag medan det för den vegetariska gruppen var 77 g/dag. Den här skillnaden är mycket större än de skillnader i proteintag som observerades mellan våra grupper (grupp 1: 98 g/dag,

grupp 2: 84 g/dag, grupp 3: 80 g/dag). Ett proteinintag på 145 g/dag är även rätt högt om man jämför med medelintaget för protein i Finland, som är 98 g/dag för män och 73 g/dag för kvinnor (FinRavinto 2017).

Gruppen med den vegetariska dieten hade ett lägre innehåll av N-nitroso föreningar i avföringen jämfört med grupperna med rött eller processat kött (Joosen m.fl. 2009). Man kunde inte se någon skillnad mellan det röda köttet och det processade köttets förmåga att inducera bildning av N-nitroso föreningar. Precis som i flera andra undersökningar utgjorde nitrosyljárn majoriteten av den totala mängden N-nitroso föreningar (Joosen m.fl. 2009). Det här överensstämmer även med resultaten i vår undersökning, där mängden N-tiol föreningar var betydligt mindre än mängden N-hem föreningar.

7.3 Proteinkällornas betydelse för kolorektal cancer

Resultaten i vår undersökning tyder på att ersättning av djurproteiner i kosten med plantproteiner leder till en mindre mängd N-nitroso föreningar i avföringen. Flera andra undersökningar har också visat på att halten av N-nitroso föreningar i avföringen oftast är mindre hos de som äter en vegetarisk kost eller en kost som är plantbaserad med små mängder kött, jämfört med de som äter en kost med större mängder rött kött (Bingham m.fl. 1996, Cross m.fl. 2003, Hughes m.fl. 2001, Joosen m.fl. 2009, Kuhnle m.fl. 2007). Huruvida en plantbaserad kost kan bidra till en minskad risk för kolorektal cancer är ändå ännu oklart, då flera studier inte visat på att risken skulle vara betydelsefullt mindre (Gilsing m.fl. 2015, Sanjoaquin m.fl. 2004). Däremot är det röda och processade köttets samband med kolorektal cancer rätt klart (IARC 2016, WCRF 2017).

Även om lägre halter av N-nitroso föreningar i avföringen kan bidra till en minskad risk för kolorektal cancer, kan man inte med säkerhet sluta sig till hur stor effekt föreningarna har på risken för kolorektal cancer. Det kan finnas andra faktorer än frånvaron av kött med en diet med litet rött kött eller en plantbaserad diet, som kan leda till den minskade risken för kolorektal cancer. Man har t.ex. observerat att vegetarianer ofta har en hälsosammare kost överlag än andra (Orlich m.fl. 2014). I undersökningar där man studerat dieter med olika mängd kött och deras samband med risken för kolorektal cancer, har man försökt se på vilka de bakomliggande orsakerna i kosten kan vara.

I en kohortstudie med 10 210 deltagare såg man att vegetarianer och de som åt litet rött kött hade en icke-betydelsefull mindre risk för kolorektal cancer jämfört med de som åt kött 6 - 7 dagar/vecka (Gilsing m.fl. 2015). Man konstaterade dock att det inte var mängden kött i sig som låg bakom denna skillnad i risk, utan istället det högre innehållet av fiber och soja i kosten hos de människor som åt helt vegetariskt eller endast litet kött. Som tidigare nämnts har t.ex. soja kunnat ses minska mängden N-nitroso föreningar i avföringen (Hughes m.fl. 2002). Soja antas utöva denna effekt genom sin förmåga att inhibera NO syntas, vilket leder till att mindre NO finns tillgängligt för bildningen av N-nitroso föreningar (Terenzi m.fl. 1995). Också i vår undersökning fick deltagarna soja i form av tofu. Gruppen med 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner fick 300 g tofu/vecka medan gruppen med 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner fick 300 g tofu varannan vecka.

I vår undersökning sågs ett betydelsefullt samband både mellan mängden fiber och N-nitroso föreningar och mängden fiber och avföringsvikten. En kost som är plantproteinbaserad innehåller ofta mycket fiber. Mycket fiber i kosten leder till att avföringen spenderar kortare tid i tarmen (Song m.fl. 2015). Desto snabbare avföringen lämnar tarmen desto kortare tid står skadliga ämnen i avföringen i kontakt med tarmens yta (Slavin m.fl. 2010). Det här är en av orsakerna till att ett högt intag av fiber förknippas med lägre risk för kolorektal cancer (Aune m.fl. 2011, WCRF 2017). Precis som soja antas fiber också kunna påverka N-nitroso föreningarnas mängd i avföringen (Hughes m.fl. 2001).

Fiber kan påverka mängden N-nitroso föreningar som bildas genom att förkorta tiden avföringen spenderar i tarmen. Mängden N-nitroso föreningar i avföringen har setts ha ett positivt samband med tiden det tar för avföringen att gå igenom tarmen. Desto längre tid avföringen är i tarmen desto effektivare kan bakterierna bryta ner proteiner, vilket leder till att det finns mera substrat i tarmen för bildningen av N-nitroso föreningar (Hughes m.fl. 2001). Olika komponenter i fiber såsom cellulosa, pektin och karragenan, har också setts kunna minska aktiviteten hos de bakterier som kan reducera nitrit och nitrat, vilket kan minska bakteriernas bildning av N-nitroso föreningar (Hughes m.fl. 2002). Utöver det här finns det också individuella skillnader i hur mycket bakterier man har i tarmen som kan reducera nitrat och nitrit och därmed bidra till ökad bildning av N-nitroso föreningar (Hughes m.fl. 2001).

Ytterligare en orsak till att en kost med ett mindre innehåll av rött och processat kött kan kopplas till en minskad risk för kolorektal cancer, kan eventuellt bero på att de som äter litet

kött ofta ersätter en del av köttproteinerna med proteiner från mjölk (Gilsing m.fl. 2015). Mjölksprodukter innehåller mycket kalcium och kalcium anses ha en sannolikt skyddande effekt mot kolorektal cancer (WCRF 2017). Kalcium antas kunna minska den cytotoxiska aktiviteten som hemjärn kan utöva, vilket är en möjlig förklaring till det här sambandet (Sesink m.fl. 2001). Rött kött innehåller rikligt med hemjärn och det förekommer i mindre mängder i andra typer av kött. Hemjärn kan fungera som en katalysator för bildningen av N-nitroso föreningar (Cross m.fl. 2003). Förutom att öka bildningen av N-nitroso föreningar kan hemjärn även påverka risken för kolorektal cancer genom att fungera som en katalysator vid bildningen av reaktiva syreföreningar (Padmanabhan m.fl. 2015).

En orsak till att vitt kött, såsom kyckling, inte har samma samband med kolorektal cancer som rött kött, anses vara på grund av att det innehåller en mindre mängd hemjärn (Bingham m.fl. 2002). Rött kött innehåller ungefär 10 gånger mera hemjärn än kyckling (Bastide m.fl. 2011). Även om tillagad kyckling är en betydande källa till HCA-föreningar i kosten, som också anses vara antagligen karcinogena, har man ändå inte sett samma samband mellan kyckling och kolorektal cancer som med rött kött (Carr m.fl. 2016). Det här tyder på att det är möjligt att det är hemjärn och inte HCA-föreningar som ökar risken för kolorektal cancer mera (Bastide m.fl. 2011).

I en prospektiv kohortstudie med 10 998 människor såg man inte att de som åt kött mera sällan än dagligen skulle ha mindre risk för utvecklingen av kolorektal cancer jämfört med de som åt kött dagligen (Sanjoaquin m.fl. 2004). Det här är ett intressant resultat som kan indikera på att det finns andra faktorer i kosten än konsumtionen av kött i sig som kan öka risken för kolorektal cancer. I den här undersökningen konstaterade man ändå att alla deltagare överlag åt väldigt hälsosamt, vilket kan innebära att andra dietära faktorer kunde skydda mot den ökade risken för kolorektal cancer, som ofta ses vid en högre konsumtion av kött. Vitamin E och vitamin C, som det finns mycket av i en hälsosam kost rik på grönsaker och frukt, kan t.ex. möjligtvis minska bildningen av N-nitroso föreningar (Loh m.fl. 2011). Grönsaker, frukt, baljväxter och sädeslag som alla är beståndsdelar i en hälsosam kost, innehåller också mycket polyfenoler (Scalbert m.fl. 2005). Dessa har kunnat ses förhindra hemjärns bildning av reaktiva syreföreningar (Bastide m.fl. 2011). Vidare nämns även att fallen av kolorektal cancer var ovanligt låg i kohorten i Sanjoaquins studie vilket eventuellt kan förklaras med de hälsosammare matvanorna (Sanjoaquin m.fl. 2004).

7.5 Undersökningens styrkor och svagheter

En styrka med vår undersökning är det mycket högre antalet undersökningsdeltagare jämfört med många andra undersökningar som studerat N-nitroso föreningar och deras samband med kosten. Den totala mängden deltagare i vår undersökning var 136 personer och 135 som togs med i den slutliga analysen av N-nitroso föreningar och N-hem föreningar i avföringen, 98 gällande N-tiol föreningar. Det här är ett avsevärt högre deltagarantal än de andra undersökningarna som behandlat N-nitroso föreningar haft, där deltagarantalet varit runt 10 personer. Ett högre deltagarantal borde kunna ge en bättre representation av befolkningen och också minska risken för att slumpen kan påverka resultaten i någon viss riktning. Längden på vår undersökning är även en styrka i och med att interventionsperioden räckte tre månader. Det här är mycket längre än någon av de andra undersökningarna pågått.

Utgångsläget gällande halterna av N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar i avföringen skiljde sig inte åt mellan de tre dietgrupperna i vår undersökning. Det här är en fördel eftersom det då är lättare att jämföra grupperna sinsemellan efter interventionsperioden. Proteinkällorna i kosten kontrollerades också noggrant, i och med att deltagarna under interventionsperioden tilldelas många av proteinkällorna i kosten från undersökningen. Det här gör det lättare att kunna sluta sig till att det är just förändringarna i kostens proteinkällor som ger upphov till förändringarna i mängden N-nitroso föreningar och andra markörer.

Även om den här undersökningen fokuserar på ersättning av djurproteiner med plantproteiner och hur det här påverkar halten av N-nitroso föreningar i avföringen, kan det finnas andra faktorer i kosten som till viss del också kan påverka halten av föreningarna. I en tidigare undersökning har t.ex. soja kunnat ses minska mängden N-nitroso föreningar i avföringen (Hughes m.fl. 2002). Även om man i vår undersökning fokuserade på att plantproteinerna skulle komma från inhemska källor, såsom exempelvis produkter baserade på bondbönor, var tofuprodukter också en del av dieten. Främst i gruppen med 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner, men också i mindre mån i gruppen med 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner.

Men eftersom den här undersökningen fokuserade på kosten som helhet sett till proteinsammansättningen, behöver sojans samband med halten av N-nitroso föreningar inte

vara en störande faktor. Det här på grund av att konsumtionen av soja är en naturlig del av en kost som till största delen består av plantproteiner, det kan därför anses vara en sideeffekt av en plantproteinbaserad kost. På samma sätt som djurproteinkällor med sitt hemjärn kan bidra till ökad bildning av N-nitroso föreningar (Cross m.fl. 2003). Man ser alltså på helheten gällande en djurproteinbaserad och en plantproteinbaserad kost.

Till svagheterna hör att det alltid är möjligt med misstag gällande undersökningar som involverar människor. Ett exempel på detta är hanteringen av avföringsproverna. Även om deltagarna fått detaljerade anvisningar om hur de skall gå till väga, kan man inte med säkerhet sluta sig till att avföringsproverna alltid behandlats enligt instruktionerna, t.ex. ifråga om att kylkedjan inte får brytas. Också vid hantering av avföringsproverna i samband med analyserna kan det ha skett misstag, även om färdigt uppgjorda protokoll följdes och proverna alltid behandlades med försiktighet och i enlighet med instruktionerna. Men mänskliga misstag kan ändå förekomma och det kan vara svårt att sluta sig till var dessa kan förekomma eftersom de oftast är omedvetna.

Gällande N-tiol föreningarna var en del värden negativa efter uträkning av mängden i avföringsproverna, eftersom halterna av N-tioler var så små att de i vissa fall inte kunde detekteras. Om en större mängd värden hade kunnat detekteras, hade det kunnat bidra med ytterligare information. Mängden av varje typ av förening i ett avföringsprov mättes en gång, för att få ytterligare information om mängden hade man kunnat utföra en parallell mätning, så att den slutliga mängden förening skulle ha räknats ut som ett medeltal av de två värdena från samma prov. Det här hade kunnat minska risken för påverkan av slumpen och omständigheter, även om det vore betydligt mera tidskrävande att utföra parallella mätningar.

Deltagarna tilldelades en stor del (2/3) av de livsmedel som konsumerades under undersökningens gång från undersökningen och de uppmanades att noggrant följa testdieten. De fick även vägledning gällande testdieten under besöken på undersökningsenheten en gång per vecka. Man kan ändå inte sluta sig till att deltagarna följde testdieten till punkt och pricka varje dag. Deltagarna fyllde dock i matdagbok fyra dagar både före interventionsperioden och under dess sista vecka. En styrka är att både vardagar och helgdagar inkluderades i matdagböckerna, eftersom matvanorna kan se litet olika ut under vardag och helg. Under interventionsperioden fylldes matdagbok i en dag per tre veckor. Även om det här ger en bild

av hur deltagarna åt under interventionsperioden, är det ändå svårt att veta exakt hur noggrant deltagarna följde den angivna kosten och hur bra dagarna som deltagarna fyllde i matdagbok, representerade deras matvanor i helhet under interventionsperioden.

Undersökningen var kontrollerad, vilket innebär att deltagarna tilldelades största delen av de livsmedel de skulle konsumera under undersökningens gång från de som ledde undersökningen. I många andra undersökningar gällande N-nitroso föreningar och kosten har deltagarna levt på en undersökningsanläggning, vilket kan göra det svårt att tillämpa resultaten för övriga människor vars kost kan variera från dag till dag. Fördelarna med vår undersökning är att resultaten lättare kan tillämpas till andra människor eftersom deltagarna fortsatte med sina normala liv under interventionsperioden. De förändringar som sågs i mängden N-nitroso föreningar är därför realistiska också för de som själva försöker lägga om sin kost och äta mera plantproteinbaserat.

7.6 Undersökningens betydelse och framtid

Den här undersökningen är av betydelse eftersom det ännu inte gjorts en så stor mängd undersökningar gällande N-nitroso föreningar och deras samband med kosten. Den är också av betydelse eftersom N-nitroso föreningar klassas som antagligen karcinogena för människan av IARC, och flera studier har också visat på deras möjliga samband med kolorektal cancer (Loh m.fl. 2001, Zhu m.fl. 2014). Kolorektal cancer är i sin tur i toppen gällande dödlighet i cancer bland icke-rökare i välutvecklade länder, vilket gör dess förebyggande ett viktigt mål för människors hälsa runt om i världen (Bastide m.fl. 2011). Det är därför önskvärt att innehållet av N-nitroso föreningar i avföringen skall vara så lågt som möjligt. Vår undersökning kan ge förslag på relativt enkla kostförändringar som kan få till stånd sänkningar i avföringens innehåll av N-nitroso föreningar. Man bör också komma ihåg att det inte endast är N-nitroso föreningarna i rött kött som anses kunna öka risken för kolorektal cancer, hemjärn, Neu5Gc, HCA och PAH föreningar är några andra substanser som också kan bidra till den ökade risken.

Processat kött anses ha ett övertygande samband med kolorektal cancer och rött kött anses ha ett troligt samband (WCRF 2017). Processat kött är det enda livsmedel förutom alkoholdrycker som anses just ha ett övertygande samband med kolorektal cancer, vilket visar på dess betydelse för utvecklingen av denna typ av cancer. Av IARC klassas också processat kött som en grupp 1 karcinogen och rött kött som en grupp 2 karcinogen (Bouvard m.fl. 2015).

Det är ändå oklart exakt hur det röda och processade köttet utövar denna effekt. Samtidigt bör man också komma ihåg att kött är en viktig proteinkälla för många eftersom det innehåller alla nödvändiga aminosyror. Kött är även en viktig källa för järn och zink. Om man uppmanar folk att ersätta en del djurproteiner i kosten med plantproteiner för att minska sin risk för kolorektal cancer, bör man också samtidigt se till att de får tillräckligt mycket information om en plantproteinbaserad kost så att de inte utvecklar brister på näringsämnen, vitaminer eller mineraler. I en tidigare undersökning föreslår man t.ex. att istället för att helt sluta konsumera rött kött, kanske man istället borde fokusera på att inhibera de mekanismer som ligger bakom det röda köttets samband med kolorektal cancer (Bastide m.fl. 2011). Det här kan vara en intressant fråga att studera mera ingående i framtiden.

Den här undersökningen visar på att det finns en större mängd N-nitroso föreningar i avföringen hos de personer som får största delen av sina proteiner från animaliska källor, jämfört med de som får största delen av sina proteiner från plantkällor. Undersökningen svarar dock inte direkt på frågan om det här är orsaken av djurproteiner överlag eller också av de ämnen som finns i rött och processat kött, såsom stora mängder hemjärn och nitriter. Som tidigare nämnts har t.ex. kyckling och fisk inte visat sig ha samma samband med kolorektal cancer som rött och processat kött (English m.fl. 2004, WCRF 2017). Men om kyckling förekommer i processade köttprodukter är fallet antagligen ett annat, eftersom processade köttprodukter kan kopplas till kolorektal cancer. En hypotes är att de som äter mera vitt kött också äter hälsosammare överlag (Miller m.fl. 2013). I vår undersökning tilldelades deltagarna däremot alla typer av proteinkällor i sin kost från undersökningen vilket betyder att antagandet att de som äter mera vitt kött annars också äter hälsosammare, inte borde påverka resultaten här, eftersom deltagarna inte själva valde om de åt rött eller vitt kött. I framtiden vore därför ett undersökningsområde att undersöka skillnaden i halten av N-nitroso föreningar mellan grupper som får sin djurproteiner från kyckling och fisk, jämfört med de som får största delen av sina djurproteiner från rött kött och hur en plantbaserad kost skulle jämföra sig med dessa två.

En fokusering på helhetskosten som vår undersökning har, kan vara lämplig om man skall implementera resultaten från en undersökning på befolkningsnivå. Det kan vara avsevärt lättare för människor att ta till sig råd om kosten som grundar sig på att man skall äta mera av exempelvis bönor, grönsaksbiffar, tofu och sojaprodukter, än att rekommendera en ökad

konsumtion av en viss beståndsdel i kosten, exempelvis fiber. Det kan vara enklare för människor att följa livsmedelsrekommendationer eftersom de inte behöver läsa innehållsförteckningen på alla livsmedel utan de kan istället välja specifika livsmedel. Viktigt att komma ihåg är att många också har litet kunskap om matens beståndsdelar, och de har kanske inte kunskap eller ork att söka upp livsmedel som innehåller låga/höga nivåer av specifika näringsämnen och substanser i maten. Om man däremot rekommenderar ett högre intag av specifika växtproteinkällor, borde man automatiskt kunna förbättra sin kost och få i sig mera av de ämnen man behöver och mindre av sådana som kan öka bildningen av N-nitroso föreningar.

Den här undersökningen säger inte något om det eventuella sambandet mellan N-nitroso föreningar och kolorektal cancer. I framtiden kunde ett undersökningsområde också vara att långsiktigt undersöka människors kost, halten av N-nitroso föreningar i avföringen och en potentiell utveckling av kolorektal cancer. N-nitroso föreningar anses ändå vara potentiellt karcinogena, vilket betyder att man borde kunna dra slutsatsen att höga halter av dessa i avföringen ger en ökad risk för kolorektal cancer.

8. SLUTSATSER

Målet med den här undersökningen var att se om det finns någon skillnad i mängden N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar i avföringen mellan människor då man ersätter en del av djurproteinkällorna i kosten med plantproteinkällor. Analyserna mellan våra grupper visar att det finns skillnader mellan de som ätit en huvudsakligen djurproteinbaserad kost och de som huvudsakligen ätit en plantproteinbaserad kost. De som ätit 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner hade en betydelsefullt mindre mängd av N-nitroso föreningar, N-hem föreningar och N-tiol föreningar i avföringen jämfört med de som ätit 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner. De som ätit 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner hade också en betydelsefullt mindre mängd N-hem föreningar i avföringen jämfört med de som ätit 50 % plantproteiner och 50 % djurproteiner.

Det är ännu oklart exakt hur N-nitroso föreningar bildas och de kan bildas genom flera olika mekanismer. Om man skulle få mera klarhet i deras bildning skulle det kunna vara lättare att ge rekommendationer, t.ex. gällande kosten, som kan minska bildningen av föreningarna. Resultaten i vår undersökning pekar på att djurproteiner ökar bildningen av N-nitroso föreningar medan plantproteiner inte ger upphov till ökad bildning. Ett högre intag av fiber hade även ett betydelsefullt samband med en mindre mängd N-nitroso föreningar i avföringen. Utgående från tidigare undersökningars resultat är det ändå mest troligt att det är skillnaden i proteinkällor, som också gav upphov till största delen av de förändringar i mängden N-nitroso, N-hem och N-tiol föreningar man kunde se mellan grupperna i vår undersökning.

Den här undersökningen pekar därför på att en plantproteinbaserad kost kan vara ett sätt genom vilket man kan minska risken för kolorektal cancer, eftersom N-nitroso föreningar anses vara potentiella karcinogener. Man kan dock inte dra några definitiva slutsatser utgående från en eller bara några få undersökningar. Mera undersökningar om ämnet behövs för att man skall kunna dra slutsatser. Men eftersom WCRF i sin rapport konstaterar att processat och rött kött har ett övertygande respektive troligt samband med kolorektal cancer, bör man i vilket fall som helst se efter alternativa proteinkällor till det processade och röda köttet i viss mån.

LITTERATURREFERENSER

Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, m.fl. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1481–7.

Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 936486.

Aune D, Chan DSM, Lau R, m.fl. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 2011; 343: d6617.

Aune D, Chan DSM, Vieira AR, m.fl. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes Control*. 2013; 24: 611–627.

Barbir A, Linseisen J, Hermann S, m.fl. Effects of phenotypes in heterocyclic aromatic amine (HCA) metabolism-related genes on the association of HCA intake with the risk of colorectal adenomas. *Cancer Causes Control*. 2012; 23: 1429–1442.

Bartsch H, O'Neill LK. Ninth International Meeting on N-Nitroso Compounds: Exposures, Mechanisms, and Relevance to Human Cancer. *Cancer Research*. 1988; 48:4711–4714.

Bastide NM, Pierre FH, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res*. 2011; 4: 177–84.

Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers complicating inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2015; 372: 1441–52.

Bingham SA, Hughes R, Cross AJ. Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J Nutr*. 2002; 132: 3522S–3525S.

Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, m.fl. Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*. 1996; 17: 515–23.

Bonnett R, Charalambides AA, Martin RA, Sales KD, Fitzsimmons W. Reactions of nitrous acid and nitric oxide with porphyrins and haem. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1975; 884–885.

Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49: 4682.

Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, m.fl. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* 2015; 16: 1599–600.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians.* 2018; 68 (6): 394-424.

Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2015; 149 (5): 1177-1190.

Carr PR, Walter V, Brenner H, Hoffmeister M. Meat subtypes and their association with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer.* 2016; 138: 293–302.

Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, m.fl. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS ONE.* 2011; 6 (6): e20456.

Chiavarini M, Bertarelli G, Minelli L, Fabiani R. Dietary Intake of Meat Cooking-Related Mutagens (HCAs) and Risk of Colorectal Adenoma and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2017; 9: 514.

Chou HH, Takematsu H, Diaz S, m.fl. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 11751–6.

Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, m.fl. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 1015–1022.

Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, m.fl. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res.* 2010; 70 (6): 2406-2414.

Cross AJ, Pollock JRA, Bingham SA. Haem, not Protein or Inorganic Iron, Is Responsible for Endogenous Intestinal N-Nitrosation Arising from Red Meat. *Cancer Research*. 2003; 63, 2358–2360.

Cross AJ, Sinha R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen*. 2004; 44: 44–55.

Cupid BC m.fl. Detection of O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine in DNA following reaction of nitric oxide with glycine and in human blood DNA using a quantitative immunoslot blot assay. *Chem Res Toxicol*. 2004; 17: 294.

de la Chapelle A, Peltomäki P. Genetics of hereditary colon cancer. *Annu Rev Genet*. 1995; 29: 329–348.

Dubrow R, Darefsky AS, Park Y, m.fl. Dietary components related to N-nitroso compound formation: a prospective study of adult glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19: 1709–22.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001; 48: 526–35.

English DR, MacInnis RJ, Hodge AM, Hopper JL, Haydon AM, Giles GG. Red Meat, Chicken, and Fish Consumption and Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13: 1509–1514.

Espejo-Herrera N, Gràcia-Lavedan E, Boldo E m.fl. Colorectal cancer risk and nitrate exposure through drinking water and diet. *Int. J. Cancer*. 2016; 139: 334–346.

Fedirko V, Bostick RM, Flanders WD, m.fl. Effects of Vitamin D and Calcium on Proliferation and Differentiation in Normal Colon Mucosa: A Randomized Clinical Trial. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2009; 18 (11): 2933–2941.

Fineli. Institutet för hälsa och välfärd. Ny version publicerad 29.06.2018.

<https://fineli.fi/fineli/fi/index>

FinRavinto 2012 -tutkimus: The National FINDIET 2012 Survey. Terveystien ja hyvinvoinnin laitos 2013. Helldán Anni, Raulio Susanna, Kosola Mikko, Tapanainen Heli, Ovaskainen Marja-Leena, Virtanen Suvi.

FinRavinto 2017 -tutkimus: Ravitseemus Suomessa. Terveystien ja hyvinvoinnin laitos 2018. Liisa Valsta, Niina Kaartinen, Heli Tapanainen, Satu Männistö, Katri Sääksjärvi (redaktörer).

Fung KY, Cosgrove L, Lockett T, m.fl. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Br J Nutr.* 2012; 108: 820–831.

Gilting AMJ, Schouten LJ, Goldbohm RA, Dagnelie PC, van den Brandt PA, Weijenberg MP. Vegetarianism, low meat consumption and the risk of colorectal cancer in a population based cohort study. *Sci. Rep.* 2015; 5: 13484.

Hamer HM, Jonkers D, Venema K, m.fl. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27: 104–119.

Hord N, Tang Y, Bryan N. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90: 1–10.

Hughes R, Cross AJ, Pollock JR, Bingham S. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis.* 2001; 22: 199–202.

Hughes R, Pollock JRA, Bingham S. Effect of Vegetables, Tea, and Soy on Endogenous N-Nitrosation, Fecal Ammonia, and Fecal Water Genotoxicity During a High Red Meat Diet in Humans. *Nutrition and Cancer.* 2002; 42 (1): 70-77.

Huxley RR, Ansary-Mogahaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer.* 2009; 125 (1): 171-180.

IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 100, a review of human carcinogens. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer 2011. Utvärderad 12 Jan 2016.

IARC. Ingested nitrates and nitrites. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks in humans, vol. 94: Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins. 2006.

Jahani-Sherafat S, Alebouyeh M, Moghim S, Ahmadi Amoli H, Ghasemian-Safaei H. Role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer; a review article. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2018; 11 (2): 101-109.

- Jakszyn P, Agudo A, Berenguer A, m.fl. Intake and food sources of nitrites and N-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutr.* 2006; 9: 785–791.
- Jeyakumar A, Dissabandara L, Gopalan V. A critical overview on the biological and molecular features of red and processed meat in colorectal carcinogenesis. *J Gastroenterol.* 2017; 52: 407–418.
- Joosen AM, Kuhnle GG, Aspinall SM, Barrow TM, Lecommandeur E, Azqueta A, Collins AR, Bingham SA. Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2009; 30: 8: 1402–1407.
- Joshi AD, Kim A, Lewinger JP, Ulrich CM, Potter JD, Cotterchio M, Le Marchand L, Mariana Stern MC. Meat intake, cooking methods, dietary carcinogens, and colorectal cancer risk: findings from the Colorectal Cancer Family Registry. *Cancer Medicine.* 2015; 4 (6): 936–952.
- Järvinen H, Kouri M, Österlund P. Suoliston syöpä. Syöpätaudit. 5. Förnyade upplagan. Duodecim, 2013.
- Kalus WH, Filby WG. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid: participation of free radicals in its anaerobic reaction with nitrite. *Experientia.* 1980; 36: 147–149.
- Key TJ, Appleby PN, Spencer EA, Travis RC, Roddam AW, Allen NE. Cancer incidence in vegetarians: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Oxford). *Am J Clin Nutr.* 2009; 89 (suppl): 1620S–6S.
- Knekt P, Jarvinen R, Dich J, m.fl. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer.* 1999; 80: 852–856.
- Kuhnle GG, Bingham SA. Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35: 1355–7.
- Kuhnle GG, Story GW, Reda T, Mani AR, Moore KP, Lunn JC, Bingham SA. Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radical Biology & Medicine.* 2007; 43: 1040–1047.

Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 935–45.

Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Cancer.* 2006; 119: 2657-2664.

Leenders M, Siersema PD, Overvad K m.fl. Subtypes of fruit and vegetables, variety in consumption and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Cancer.* 2015; 137 (11): 2705-2714.

Lewin MH m.fl. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res.* 2006; 66: 1859.

Lijinsky W. N-nitroso compounds in the diet. *Mutat Res.* 1999; 443: 129–38.

Loh YH, Jakszyn P, Luben RN, m.fl. N-nitroso compounds and cancer incidence: the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)—Norfolk Study. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93: 1053–61.

Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010; 14 (4): 840-60.

Lunn JC, Kuhnle G, Mai V, Frankenfeld C, Shuker DEG, Glen RC, Goodman JM, Pollock JRA, Bingham SA. The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. *Carcinogenesis.* 2007; 28 (3): 685–690.

Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 919–32.

Massey RC, Key PE, Mallett AK, Rowland IR. An investigation of the endogenous formation of apparent total N-nitroso compounds in conventional microflora and germ-free rats. *Food Chem Toxicol.* 1988; 26: 595–600.

Mecklin J-P, Malila N, Kääriäinen H, Pajari A-M, Färkkilä M. Suolistosyövän riskitekijät ja ehkäisyn mahdollisuudet. *Duodecim.* 2016; 132: 1145–52.

Miller PE, Lazarus P, Lesko SM, Cross AJ, Sinha R, Laio J, Zhu J, Harper G, Muscat JE, Hartman TJ. Meat-Related Compounds and Colorectal Cancer Risk by Anatomical Subsite. *Nutr Cancer*. 2013; 65 (2): 202–226.

National Cancer Institute. Publikationer: NCI Dictionary of Cancer Terms. Hämtat 15.3.2018.
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>

Naturresursinstitutet – Luke. Vad åt vi i Finland 2017. 29.06.2018.
<https://www.luke.fi/sv/nyheter/vad-at-vi-i-finland-2017/>

Newmark HL, Wargovich MJ, Bruce WR. Colon Cancer and Dietary Fat, Phosphate, and Calcium: A Hypothesis. *JNCI*. 1984; 72 (6): 1323–1325.

Norat T m.fl. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J. Natl. Cancer Inst*. 2005; 97: 906.

Norat T, Riboli E. Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57 (1): 1-17.

Orlich MJ, Jaceldo-Siegl K, Sabaté J, Fan J, Singh PN, Fraser GE. Patterns of food consumption among vegetarians and non-vegetarians. *Br J Nutr*. 2014; 112 (10): 1644–1653.

Orlich MJ, Singh PN, Sabaté J, m.fl. Vegetarian Dietary Patterns and the Risk of Colorectal Cancers. *JAMA internal medicine*. 2015; 175 (5): 767-776.

Padmanabhan H, Brookes MJ, Iqbal T. Iron and colorectal cancer: evidence from *in vitro* and animal studies. *Nutr Rev*. 2015; 73 (5): 308-17.

Parkin DM, Boyd L, Walker LC. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer*. 2011; 105 (Suppl 2): S77–81.

Pereira MA, Jacobs DR Jr, Pins JJ, m.fl. Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75: 848–855.

Pignatelli B, Malaveille C, Rogatko A, Hautefeuille A, Thuillier P, Munoz N, Moulinier B, Berger F, De Montclos H, Lambert R. Mutagens, N-nitroso compounds and their precursors in gastric juice from patients with and without precancerous lesions of the stomach. *Eur J Cancer*. 1993; 29A: 2031–2039.

- Qiao L, Feng Y. Intakes of heme iron and zinc and colorectal cancer incidence: a meta-analysis of prospective studies. *Cancer Causes Control*. 2013; 24: 1175–83.
- Rajalakshmi TR, Aravindh Babu N, Shanmugam KT, Masthan KM. DNA adducts-chemical add-ons. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015; 7 (Suppl 1): 197–S199.
- Rao, C. V. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat Res*. 2004; 555: 107.
- Richardson G, Benjamin N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clin Sci (Lond)*. 2002; 102: 99–105.
- Samraj AN, Pearce OM, Läubli H, et al. A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112: 542–7.
- Sanjoaquin MA, Appleby PN, Thorogood M, Mann JI, Key TJ. Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10 998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. *British Journal of Cancer*. 2004; 90: 118 – 121
- Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer*. 2008; 60: 131–44.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005; 45 (4): 287-306.
- Sesink ALA, Termont DSML, Kleibeuker JH, VanDerMeer R. Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. *Carcinogenesis*. 2001; 22: 1653–9.
- Silvester KR, Bingham SA, Pollock JR, et al. Effect of meat and resistant starch on fecal excretion of apparent N-nitroso compounds and ammonia from the human large bowel. *Nutr Cancer*. 1997; 29: 13–23.
- Slavin JL. Mechanisms for the impact of whole grain foods on cancer risk. *J Am Coll Nutr*. 2000; 19: 300S-7S.
- Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control*. 1991; 2: 427-42.
- Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 387 – 95.

Suomen syöpärekisteri. Syöpätilastot. 2016.

<https://syoparekisteri.fi/tilastot/tautitilastot/>

Terenzi F, Diaz-Guerra MJM, Casado M, Hortelano S, Leoni S, m.fl. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. *J Biol Chem*. 1995; 270: 6017–6021.

Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001; 81: 1031–1064.

Tricker AR. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev*. 1997; 6: 226–68.

Tricker AR, Preussmann R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat Res*. 1991; 259: 277–289.

Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, m.fl. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology*. 1996; 110: 1020-1027.

VRN. Valtion ravitsemusneuvottelukunta. Suomalaiset ravitsemussuosituksat 2014.
https://www.evira.fi/globalassets/vrn/pdf/ravitsemussuosituksat_2014_fi_web.3_es-1.pdf

Wade RS, Castro CE. Redox reactivity of iron (III) porphyrins and heme proteins with nitric oxide. Nitrosyl transfer to carbon, oxygen, nitrogen and sulphur. *Chem Res Toxicol*. 1990; 3: 289–291.

Weitz J, Koch M, Debus J, m.fl. Colorectal cancer. *Lancet*. 2005; 365: 153-165.

Williams DLH. Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide. Elsevier. 2004; 1.

World Cancer Research Fund International/American Institute for Cancer Research.
Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical activity and Colorectal cancer.
2017. wcrf.org/colorectal-cancer-2017.

Xu X, Yu E, Gao X, m.fl. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer*. 2013; 132: 437–448.

Zhu Y, Wang PP, Zhao J, m.fl. Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada. *Br J Nutr.* 2014; 111: 1109–17.

BILAGOR

Bilaga 1: Instruktioner för tagning av avföringsprov (slutskedet)

Bästa undersökningsdeltagare,

Du har fått provtagningstillbehör för insamlingen av avföringsprov. Samla in proven från **tre dagar under den sista dietveckan**.

Styroxväskan innehåller följande redskap som behövs för provtagningen:

- 3 - 4 kylackumulatorer
- Rondsålar
- En stor plastpåse
- Våg
- 1 minigrip-påse, där det finns
 - o två (2) plastburkar med lock
 - o 1 provrör, med inbyggd sked för provtagning
 - o 1 engångssked
 - o engångshandskar
- 2 minigrip-påsar, i vilka båda finns
 - o två (2) plastburkar med lock
 - o 1 engångssked
 - o engångshandskar
- Permanent-tusch
- En blankett för provtagningsinformationen och en anvisning för att utvärdera avföringens konsistens på Bristol-skalan

Provtagning:

Läs noggrant igenom instruktionerna före provtagningen.

- **Frys kylackumulatorerna** i god tid före återlämning av proverna. Proverna återlämnas frysta tillsammans med kylackumulatorerna förpackade i styroxväskan. I samma styroxväska kan det också finnas dygnsurinprover, om du återlämnar proverna på samma dag.
- **Avföringsproverna samlas in från tre dagar.** Dagarna behöver inte vara efter varandra följande, men i vilket fall som helst från samma vecka (7 dagar).
- **Alla** avföringssatser från insamlingsdagen **vägs först på vågen** och vikterna skrivs upp på blanketten. Prov **tas endast från en avföringssats per dag** genom att följa följande instruktioner.
 - o Töm tarmen på rondsålen. **Väg avföringen på vågen och skriv upp vikten på blanketten.** Vågen behöver inte tareras, du behöver alltså inte subtrahera rondsålels vikt (det gör vi här). **Utvärdera avföringens konsistens på Bristol-skalan, som finns åskådliggjord i slutet av de här instruktionerna, och skriv upp avföringens typ i tabellen på skalan 1 – 7.**
 - o Om du tömmer tarmen flera gånger per dag, kom ihåg att väga alla produktioner och skriva upp det på blanketten.
 - o Ta endast prov från en avföringsgång per dag, inte från alla.
 - o Ta provröret och -burken ur påsen, där det står DAG 1.

- Ta först en **ordentlig sked** avföring från avföringens mitt, så att inte möjliga hårda tappar från början kommer med, till provröret (på klisterlappen: Mikroprov B) med hjälp av skeden som finns i provröret. Stäng korken ordentligt.
- Ta avföring (från mittpunkten) med engångsskeden till den lockförsedda plastburken (på klisterlappen PROV 1B) ungefär 1/3 av burkens volym. Stäng locket noggrant. All avföring behöver inte sättas i burken, överloppet får stjälpas i WC-stolen.
- Var uppmärksam på att avföring inte lämnar utanpå provröret eller burken.
- **Märk** både på provrörets och burkarnas klisterlappar **datumet** för provtagningen med permanent tusch.
- **Sätt röret och burkarna i minigrip-påsar**, där ditt namn finns, och **frys omedelbart**.
- Utför provtagningen i burkarna på samma sätt också på DAGARNA 2 och 3.

Förvaring av proverna hemma och transport till undersökningsenheten:

- **Förvara proverna i frysen** i namngivna minigrip-påsar tills dess att du transporterar dem till Vik.
- För de frysta proverna tillsammans med de **frysta kylackumulatorerna** i styroxväskan. Du kan samtidigt också föra dygnsurinproverna, om du för proverna samtidigt och de ryms i samma kylväska. Vid behov kan avföringsproverna vänta i frysen, men urinproven måste föras till undersökningsenheten genast efter insamlingens avslutande dag.
 - För transporten läggs kylackumulatorerna och proverna som är i minigrip-påsarna i en stor plastpåse och påsen knyts ihop till ett tätt paket. På det här sättet säkerställs att proverna inte slipper åt att smälta under transporten.
- De frysta proverna kan återlämnas till undersökningsenheten i Vik
 - då du kommer till provtagningen för det fastande blodprovet
 - eller också före provtagningsdagen mellan kl. 8 – 15:30; anmäl i så fall din ankomst i förväg till telefonnumret 02941 58326 antingen genom att ringa eller som SMS.
- Minimera tiden proverna är utanför frysen, **avföringsproverna får inte smälta** under transporten!
- Kom ihåg att också lämna tillbaka den ifyllda blanketten

Provtagningen och överföringen till burk är lättast att utföra hemma, så att kylförvaringen/nedfrysningen lyckas bäst. Om avföringsgångerna är flera under en dag, bör du **förbereda dig på att också väga avföringen utanför hemmet**. I sådana fall räcker det med att du har med dig en våg, rondskål och vägningsblanketten. Ha också med dig en skräppåse, i vilken du kan lägga den smutsiga rondskålen i soporna. Töm tarmen på rondskålen, väg och skriv upp vikten på blanketten.

Vid alla frågor rörande provtagningen kan du vara i kontakt med Essi Päivärinta, (tel. 02941 58326, scenoprot-tutkimus@helsinki.fi).

VI TACKAR DIG FÖR DITT DELTAGANDE!

ScenoProt-tutkimusryhmä
Helsingin yliopisto, ravitsemustieteen osasto,
Viikin kampus, EE-talo 2. krs

Undersökningens personens namn: _____

AVFÖRINGSPROV och INFORMATION (slutbesöket)

Skriv upp informationen från tre dagar och ta proverna enligt de anvisningar som fåtts.

DATUM	Klockslag	Avförings- satsens mängd (g)	Från vilken sats togs provet? (X)	Avföringens typ på Bristol-skalan (1 – 7)

Undersökningens enheten fyller i:

Provernas återlämnings datum: _____ kl: _____

Provens mottagare: _____

Övriga anmärkningar:

Utvärdering av avföringens konsistens på Bristol-skalan

Typ 1: skilda hårda klumpar, "kaninkulor"



Typ 2: enhetlig, fast och klart knölig "bullalängd"



Typ 3: korvaktig, men bristningar i ytan



Typ 4: "banan", slät och mjuk



Typ 5: mjuka skilda klumpar, i vilka det finns vassa, "klippta" kanter



Typ 6: porös, götaktig; ojämna kanter



Typ 7: helt flytande, inga fasta bitar; diarré



Källa: Heaton m.fl. 1992

Bilaga 2: Avföringsvikt och korrelation

TABELL. Medelvikten (g) för de två avföringstillfällena varifrån avföringsprover togs före interventionsperiodens början (vecka 0) och under dess sista vecka (vecka 12). Grupp 1: 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, grupp 2: 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och grupp 3: 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner.

Grupp	N	Vecka 0	Vecka 12	Grupper		P-värde ¹
Djur 70: plant 30	45	397 ± 186	394 ± 143	1	2	0,021
Djur 50: plant 50	44	395 ± 194	502 ± 249	1	3	0,077
Djur 30: plant 70	42	402 ± 209	481 ± 168	2	3	1,000

¹Kovariansanalys med utgångsläget som kovariat, signifikant om <0,05.

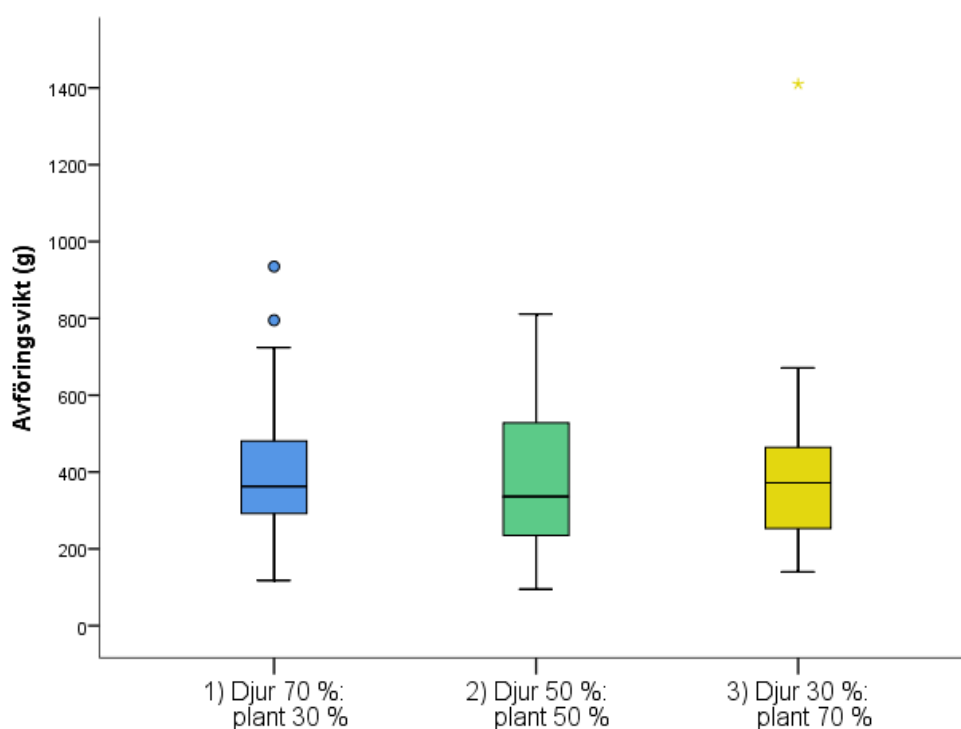


BILD. Den sammanlagda vikten i gram för de två avföringstillfällena varifrån avföringsprover togs före interventionsperiodens början. Boxarna innehåller hälften av observationerna och tvärstrecket visar medianens plats. Streckens avslut motsvarar det största och minsta observerade värdet; avvikande värden betecknas med cirklar och stjärnor.

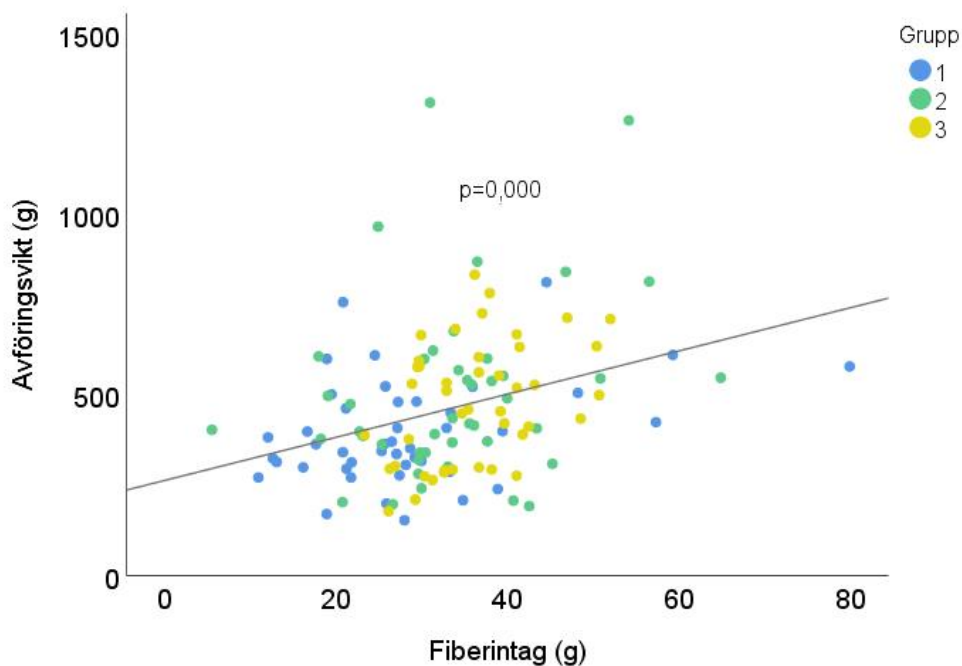


BILD. Korrelation mellan fiberintaget och avföringsvikten under vecka 12. Grupp 1: 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, grupp 2: 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och grupp 3: 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner. Pearson korrelation där gränsen för statistisk signifikans är $<0,05$.

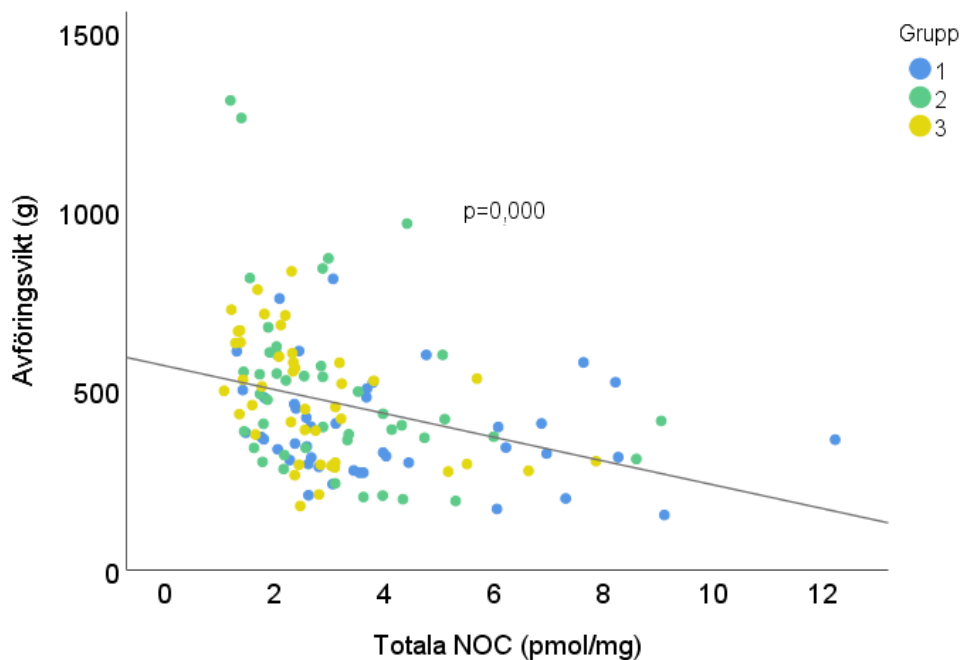


BILD. Korrelation mellan den totala mängden N-nitroso föreningar och avföringsvikten under vecka 12. Grupp 1: 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, grupp 2: 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och grupp 3: 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner. Pearson korrelation där gränsen för statistisk signifikans är $<0,05$.

Bilaga 3: Intag av fiber och protein

TABELL. Intaget av protein, fiber, icke-vattenlösliga fiber och vattenlösliga fiber i grupperna under vecka 0 och vecka 12. Anges som medeltalet för varje grupp i gram/dag. Grupp 1: 70 % djurproteiner och 30 % plantproteiner, grupp 2: 50 % djurproteiner och 50 % plantproteiner och grupp 3: 30 % djurproteiner och 70 % plantproteiner.

Komponent	Grupp 1		Grupp 2		Grupp 3	
	Vecka 0	Vecka 12	Vecka 0	Vecka 12	Vecka 0	Vecka 12
Protein	99,3 ± 32,1	97,9 ± 28,9	88,4 ± 25,9	83,9 ± 18,2	91,4 ± 23,4	79,5 ± 15,1
Fiber, totalt	29,9 ± 12,2	28,4 ± 13,2	28,3 ± 8,7	33,7 ± 10,9	27,5 ± 8,4	36,2 ± 7,1
Ej vattenlöslig	18,8 ± 7,5	19,1 ± 8,7	17,5 ± 5,0	21,4 ± 6,8	17,6 ± 4,9	23,0 ± 4,9
Vattenlöslig	7,0 ± 3,1	6,8 ± 3,3	6,9 ± 2,4	7,2 ± 2,7	6,6 ± 1,6	7,3 ± 1,4

TABELL. P-värden för korrelation mellan de olika typerna av föreningar och protein och fiber under vecka 0 och vecka 12.

Komponent	N-nitroso		N-hem		N-tiol	
	Vecka 0	Vecka 12	Vecka 0	Vecka 12	Vecka 0	Vecka 12
Protein	0,557 ¹	0,622	0,455	0,837	0,608	0,851
Fiber, totalt	0,045	0,036	0,046	0,025	0,183	0,813
Ej vattenlösliga	0,054	0,067	0,054	0,059	0,203	0,647
Vattenlösliga	0,086	0,282	0,063	0,210	0,112	0,390

¹ P-värde för Pearson korrelation, signifikant om <0,05.